

Säurestabile Elastase-Inhibitoren
im Humanserum

Patrik von Schoenaich

Diss. München
1984



Aus dem biochemischen Laboratorium (Leitung Prof. Dr. Dr. K.
Hochstraßer) der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Universität Mün-
chen (Direktor: Prof. Dr. H. H. Naumann)

Säurestabile Elastase-Inhibitoren im Humanserum

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Patrik von Schoenaich
aus
Planegg

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. K. Hochstraßer
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H.H. Naumann
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	27. März 1984

Herrn Prof. Dr. Dr. K. Hochstraßer danke ich für die Bereitstellung des Themas, für einen sehr gut eingerichteten Laborplatz und nicht zuletzt für die immerwährende Unterstützung auch und vor allem, nachdem abzusehen war, daß die Arbeit die erhofften Resultate nicht bringen konnte.

Weiter gilt mein herzlicher Dank allen Mitarbeitern Prof. Hochstraßers. Besonders Frau K. Lempart, die mir bei den Immunelektrophoresen tatkräftig zur Seite stand und Herrn Dr. Ö.L. Schönberger, der bei theoretischen Fragen stets Rat wußte.

Schließlich will ich meinem Freund dem Architekten Hannes Honigmann für professionelle Hilfsmittel bei der Anfertigung der Graphiken danken.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	IV
1. EINLEITUNG	1
2. DIE PROTEINASEINHIBITOREN DES HUMANSERUMS	2
2.1. Einführung	2
2.2. Rückblick auf die Geschichte der Proteaseinhibitor-Forschung	4
2.3. Standard-Reaktionsmechanismus der Proteaseinhibitoren	5
2.4. Differenzierte Darstellung der einzelnen Proteaseinhibitoren	6
2.4.1. Das α_2 -Makroglobulin	6
2.4.1.1. Der Hemmechanismus nach BARRET und STARKEY	6
2.4.1.2. Die physiologische Funktion des α_2^M	8
2.4.2. Der α_1 -Proteaseinhibitor	8
2.4.2.1. Verschiedene Phänotypen	8
2.4.2.2. Stabilität	8
2.4.2.3. Der Hemmechanismus	9
2.4.2.4. Physiologische Funktion des α_1 PI	9
2.4.3. Der Inter- α -Trypsin-Inhibitor	10
2.4.3.1. Die physiologischen Derivate des I α I	10
2.4.3.2. Der physiologische Inhibitor HI-30 und seine "künstlichen" Derivate	11
2.4.3.3. Der I α I aus physio- und pathophysiologischer Sicht	11
2.4.4. Das α_1 -Antichymotrypsin	13
2.4.5. Das Antithrombin III	14
2.4.6. Der C ₁ -Inaktivator	14
2.4.7. Das α_2 -Antiplasmin	14
3. ERGEBNISSE	15
3.1. Einführung	15
3.2. Zusammenfassung des Zahlenmaterials in Mittelwerten und Gegenüberstellung der Ergebnisse in Grafiken	15
3.2.1. Versuche mit dem nativen Serum	20
3.2.2. Versuche mit dem enteiweißten Serum	20
3.2.3. Die Inhibitorkonzentration vor und nach dem Denaturieren der Seren	25

II

3.2.3.1.	Die Immunelektrophorese	25
3.2.3.2.	Die Trypsinhemmung	29
3.2.3.3.	Die Elastasehemmung	29
3.2.3.4.	Tatsächliche und erwartete inhibitorische Aktivität der enteweißten Seren	29
4.	DISKUSSION	33
4.1.	Trypsin- bzw. Elastasehemmung und α_1 PI-Konzentration im nativen Serum	33
4.2.	Trypsinhemmung und Immunelektrophorese der enteweißten Seren	33
4.3.	Elastasehemmung und Immunelektrophorese der enteweißten Seren	35
4.3.1.	Die säurestabile Elastasehemmung	36
5.	EXPERIMENTELLER TEIL	38
5.1.	Fehlerrechnung	38
5.2.	Die Serumverdünnung	46
5.3.	Das Enteweißen	46
5.4.	Die Hemmtests	46
5.4.1.	Das Prinzip	46
5.4.2.	Der Trypsinhemmtest	47
5.4.2.1.	Die Reagenzien	47
5.4.2.1.1.	Vorbereitung des TRA-Puffers	47
5.4.2.1.2.	Vorbereitung des Trypsins	47
5.4.2.1.3.	Vorbereitung des B ₂ -Arg-Nan	47
5.4.2.2.	Ansatz und Durchführung	47
5.4.3.	Der Elastasehemmtest	48
5.4.3.1.	Die Reagenzien (soweit nicht schon beim Trypsin- test beschrieben)	48
5.4.3.1.1.	Vorbereitung der Elastase	48
5.4.3.1.2.	Vorbereitung des Suc-(Ala) ₃ -Nan	48
5.4.3.2.	Ansatz und Durchführung	49
5.5.	Die Immunelektrophorese nach LAURELL (44)	49
5.5.1.	Das Prinzip	49
5.5.2.	Die Reagenzien	50
5.5.2.1.	Vorbereitung der Agarose	50
5.5.2.2.	Vorbereitung des Stampfpuffers	50
5.5.2.3.	Die Antikörper	50

III

5.5.2.4.	Vorbereitung des Serums	50
5.5.2.5.	Färber und Entfärber	50
5.5.3.	Durchführung	50
6.	ZUSAMMENFASSUNG	52
LITERATURVERZEICHNIS		53

Verzeichnis der Abkürzungen

Inhibitoren:

PI = Protease-Inhibitor
 α_1 PI = α_1 -Protease-Inhibitor
 α_1 X = α_1 -Antichymotrypsin
 I α I = Inter- α -Trypsin-Inhibitor
 AT III = Antithrombin III
 C₁-INA = C₁-Inaktivator
 α_2 M = α_2 -Makroglobulin
 HI-30 = Human-Inhibitor, MG = 30 000
 HI-14 = Human-Inhibitor, MG = 14 000
 HI- 8 = Human-Inhibitor, MG = 8 000

Substrate:

B₂-Arg-Nan = N-Benzoyl-arginin-4-nitroanilid-Hydrochlorid
 Suc-(Ala)₃-Nan = Succinyltrialanin-p-Nitroanilid

Fehlerrechnung:

$\bar{X}$ = Mittelwert
 s = Standardabweichung
 VK = Variationskoeffizient

Puffer:

TRA = Triäthanolamin

Sonstige Abkürzungen:

(S)IA = (Serum)-Inhibitor-Aktivität
 EIU = Elastase Inhibiting Units
 TIU = Trypsin Inhibiting Units

1. EINLEITUNG

Seit den Untersuchungen von PEANASKY und LASKOWSKY (52), SHULMAN (58) und ASTRUP (2,3) in den fünfziger Jahren, weiß man, daß sich im menschlichen Serum und Urin säurestabile PI'en befinden. Während die Inhibitoren α_1 PI, AT III, C₁-INA und α_2 M als säurelabil gelten, zeigten HOCHSTRASSER und WACHTER (32, 33, 60, 61), daß sich der I α I als Precursor des säurestabilen Serum-Trypsin-Plasmin-Inhibitors HI-30 definieren läßt. Und die inhibitorische Aktivität, die HOCHSTRASSER für den HI-30 gegenüber Trypsin maß, entspricht auch in der Tat jenem Anteil von 1-3 Prozent der Aktivität des nativen Serums, der nach Deproteinisierung des Serums im Überstand verbleibt.

Arbeiten mit großen Mengen enteweißten Serums ergaben jedoch immer wieder eine Hemmung nicht nur von Trypsin, sondern auch von Pankreas-Elastase. Diese Elastasehemmung läßt sich aber nicht auf I α I oder eines seiner Abbauprodukte zurückführen.

Die bekannten Elastase-Inhibitoren des menschlichen Serums sind α_1 PI und α_2 M, von deren Säureelastasehemmung man seit eh und je ausgeht und die auch schon am isolierten α_1 PI gezeigt wurde (39, 40).

Die hier angesprochenen Versuche sollen den Rahmen dieser Arbeit bestimmen und leiten zu folgenden Fragestellungen:

1. Läßt sich die gefundene Elastasehemmung - wider Erwarten - vielleicht doch auf den α_1 PI zurückführen, bzw. auf säurestabile Komponenten dieses Inhibitors ähnlich wie im Falle des I α I und des HI-30?
2. Oder, wenn dem nicht so ist, liegt hier ein derzeit noch unbekannter Inhibitor vor?
3. Schließlich: Ist dieser "neue" Inhibitor ein unphysiologisches Produkt, entstanden infolge der Denaturierung des Serums?



2. DIE PROTEINASEINHIBITOREN DES HUMANSERUMS

2.1. Einführung

Das menschliche Serum enthält weit mehr als hundert einzelne Proteine (23), die sich mit der Papierelektrophorese den klassischen fünf Fraktionen zuordnen lassen: Albumine, α_1 -, α_2 -, β - und γ -Globuline. Auch in der Nomenklatur mancher PI'en läßt sich diese Einteilung wiederfinden, z.B. α_1 PI oder α_2 M.

Eine weitere Auftrennung in über dreißig Komponenten ist mit der Disk- oder Immunelektrophorese möglich (37).

Man geht davon aus, daß jedem der Proteine mehr oder weniger spezifische physiologische aber auch pathologische Funktionen zukommen. Hier nur zwei Beispiele, die anschaulich zeigen, wie komplex das Verhalten der Proteine ist.

1. Transportfunktion

Grundsätzlich kann ein Transporteiweiß spezifisch einen Stoff binden oder aber auch mehrere. Andererseits können verschiedene Proteine ein und dieselbe Transportfunktion übernehmen. Hierzu drei der überaus großen Zahl von Möglichkeiten:

- a) Transferrin bindet und transportiert ausschließlich Eisen.
- b) Albumin bindet neben Kupfer, Häm, Bilirubin und Fettsäuren auch Hormone, wie z.B. Thyroxin.
- c) Thyroxin wird auch von Präalbumin gebunden, spezifisch aber nur vom Thyroxinbinden Globulin.

2. Träger des immunologischen Gedächtnis'

Alle Antikörper sind Proteine, die von den Plasmazellen produziert werden. Diese Proteine bilden mit den Antikörpern Komplexe in Form nicht-kovalenter Bindungen. Meist werden dann die Komplexe von den Makrophagen des retikuloendothelialen Systems phagozytiert.

Bei mäßigem Antigenüberschuß jedoch setzen sich die Komplexe an den Zellwänden und Gefäßen ab, aktivieren Komplement und induzieren eine Entzündung.(55).

Diese Komplexenaktivierung ist ein Beispiel für eine besondere

Wirkungsweise der Proteine, die sich erst in und nach der Reaktion eines Proteins mit anderen aufzeigt. Dabei kann eine Reaktion der anderen in Form einer Kaskade folgen.

Im Falle des Komplements haben wir es mit einem System aus neun Einzelkomponenten (C_1-C_9), bzw. elf Serumproteinen zu tun, die nach der Antigen-Antikörper-Reaktion in einer festgelegten Sequenz aktiviert und gebunden werden (20).

Kaskadenartige Reaktionen liegen aber auch im Falle der Blutgerinnung und Fibrinolyse oder etwa dem Kallikreinsystem vor. Ganz ähnlich, wenngleich in einem Ein-Schritt-Verfahren, funktioniert die Aktivierung mancher Verdauungsfermente. Hier setzen Proteinasen Enzyme aus ihren inaktiven Vorstufen frei. So überführt etwa Enterokinase, aber auch Trypsin selbst - im Sinne eines positiven feed-back-Mechanismus - Trypsinogen in Trypsin. Die Endprodukte dieser Reaktionsketten, hier wie oben, sind Enzyme.

Wo also der menschliche Organismus über Möglichkeiten verfügt, die ein rasches "Anschalten" einer Enzymreaktion erlauben, ist es einleuchtend, daß auch "Abschalt"-Mechanismen gebraucht werden. Dieses Abschalten proteolytischer Enzyme erfolgt durch besonders strukturierte Proteine. Dabei heißt die Inaktivierung der Proteinasen Hemmung, und die hemmenden Eiweiße werden allgemein Proteinaseinhibitoren genannt.

Um jedoch nicht jedes Protein, welches enzymatische Aktivitäten mindert, als PI bezeichnen zu "dürfen", ist eine genauere Definition nötig. Hierzu sollen drei Aussagen dienen, welche nach LASKOWSKY jr. (42) für die meisten aller Inhibitoren gelten. (Eine Ausnahme bildet das α_2^M , worauf später noch eingegangen werden wird.)

1. Das an den Inhibitor gebunden Enzym hat gegenüber allen Substraten keine Wirkung mehr.
2. Die Hemmung ist streng kompetitiv.
3. Ein bestimmtes reaktives Zentrum (s.p.5) eines Inhibitors kann nur Proteasen hemmen, die zu einer der vier mechanistischen Klassen gehören, die HARTLEY (19) postuliert.

Ist man auch noch weit davon entfernt, die Funktionen der PI'en im Detail zu kennen, so liegt es doch nahe, anzunehmen, daß sie die Wirkung der Enzyme den biologischen Erfordernissen angleichen sollen.

2.2. Rückblick auf die Geschichte der Proteaseinhibitor-Forschung

Schon seit 1894 weiß man von FERMI und PERNOSSI (15) um die antitryptische Aktivität des Serums, die LANDSTEINER (43) 1900 in der Albuminfraktion der Plasmaproteine nachwies.

In den folgenden Jahren bemühte man sich, den chemischen Charakter sowie die biologische Natur der PI'en zu präzisieren. Und EISNER (13), HEDIN (21), MEYER (46) und WIENS (62) sprachen von "Antifermenten", weil sie glaubten, die PI'en entsprächen Antikörpern. Damit kamen sie dem Reaktionsmechanismus der PI'en, wie wir ihn uns heute vorstellen, schon recht nahe.

Auch die Pathophysiologie nahm sich des neuen Parameters an, und man versuchte, Abweichungen vom Normwert der antitryptischen Aktivität mit verschiedenen Krankheitsbildern, wie etwa der Pneumonie (1), zu korrelieren. Bei Krebserkrankungen fanden schon 1908 BRIEGER und TREBING (9) erhöhte Werte, die sich jedoch nicht als spezifisch erwiesen.

1905 entdeckte MORAWITZ (47) die gegen das Thrombin gerichtete Aktivität des Serums.

Erste Versuche, die PI'en zu isolieren, hatten nur teilweise Erfolg, da sie stets eine partielle Denaturierung der PI'en zur Folge hatten. Das bedeutet, daß die 1900 von LANDSTEINER (43) und 1983 von SCHMITZ (56) erwähnten PI'en nicht den heute bekannten PI'en zugesprochen werden können.

In den vierziger und fünfziger Jahren erlaubten immer feinere Elektrophorese-Techniken, die gefundenen Inhibitoraktivitäten verschiedenen Zonen des Serumelektrophoregramms zuzuordnen. So fand JAKOBSSON (35) 90 Prozent der antitryptischen Aktivität in der α_1 - und 10 Prozent in der α_2 -Globulin-Zone, sowie Antiplasminaktivität ausschließlich in der α_2 -Zone.

1959 gelang BUNDY und MEHL (10) die Isolierung des nativen α_1 PI.

Heute kennen wir sieben PI'en des menschlichen Serums, deren Beschreibung im Einzelnen nach einer kurzen Darstellung des Mechanismus' ihrer Wirkung folgen soll.

2.3. Standard-Reaktionsmechanismus der Proteaseinhibitoren

Von einem Standardmechanismus wird hier gesprochen, weil dieser die Wirkungsweise des "Ausnahmeinhibitors" α_2^M nicht erklären kann. Letzteres soll, wie einführend bereits angedeutet, im Rahmen der Besprechung des α_2^M erläutert werden.

Die Hemmung läßt sich stark vereinfacht in drei Schritte zerlegen:

1. Komplexbildung.
2. Limitierte Hydrolyse im aktiven Zentrum der Protease.
3. Acylierung der Protease.

Inhibitor und Protease haben nur im Bereich eines sehr kleinen Molekülanteils miteinander Kontakt, hier aber ist die Bindung via Van der Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken sehr fest. Somit kann man von einer "lock and key interaction" sprechen (42). (Vgl. Antigen-Antikörper-Bindung!)

Weiter ist es wichtig, zu verstehen, daß auch die PI'en ein Substrat für die Proteasen bilden (42). Die Inhibitoren verfügen an ihrer Oberfläche über mindestens eine Peptidbindung, die spezifisch mit dem aktiven Zentrum der "angesprochenen" Protease reagiert. Diesen Teil des Inhibitormoleküls nennt man das reaktive Zentrum.

Während jedoch im Falle normaler Substrate das Gleichgewicht der Hydrolyse, d.h. der Spaltung jener Peptidbindung, weit auf seiten der Spaltung liegt, ist hier die Reaktionsgeschwindigkeit so langsam, daß sich die Gleichgewichtskonstante zwischen ursprünglichem und hydrolysiertem Inhibitor unendlich nähert. Das bedeutet, daß im Gleichgewicht fast nur nicht hydrolysierte Inhibitor vorliegt, bzw. Enzym und freier PI auf der einen und der Komplex auf der anderen Seite.

Schließlich kann selbst der modifizierte, sprich hydrolysierte Inhibitor noch einen Komplex mit der Protease formen.

Die eigentliche Hemmung geschieht in der Folge einer Acylierung des aktiven Zentrums (57).

Zusammenfassend kann man wie folgt formulieren: PI'en vermögen Proteasen zu hemmen, weil sie diese schneller im Komplex binden als sie von den Proteasen hydrolysiert werden.

LASKOWSKY und KATO (42) schreiben hierzu jedoch: "Why inhibitors are inhibitors, not just excellent substrates", sei derzeit noch nicht zu klären.

2.4. Differenzierte Darstellung der einzelnen Proteaseinhibitoren

Im Folgenden sollen die drei PI'en α_1 PI, α_2 M und I α I ausführlicher behandelt werden, weil sie für die vorliegende Arbeit besonders relevant sind: Einerseits dominieren im menschlichen Serum α_2 M und α_1 PI als Inhibitoren der Elastase (16), andererseits nehmen die Derivate des I α I die führende Rolle unter den derzeit bekannten säurestabilen Inhibitoren ein.

2.4.1. Das α_2 -Makroglobulin

Das α_2 M sei hier zuerst angesprochen, weil es sich, wie bereits erwähnt, in mehrfacher Hinsicht von den anderen Inhibitoren unterscheidet.

α_2 M hat ein MG von 720 000. Das ist mehr als zehnmal soviel wie das der anderen PI'en des Humanplasmas. α_2 M besteht aus vier Polypeptidketten, die sich zu zwei Paaren denaturieren lassen. Bei Reduktion der Disulfidbrücken erhält man die einzelnen Ketten (7, 8).

2.4.1.1. Der Hemmechanismus des α_2 M nach BARRET und STARKEY (7)

Während beim Standardmechanismus (s.p. 5) weniger eine Konformationsänderung im reaktiven Zentrum des PI als vielmehr die Acylierung der Protease die Hemmung bewirkt, spielt hier die Konformationsänderung des α_2 M eine entscheidende Rolle. Das soll Abb. 1 auf p. 7 erläutern.

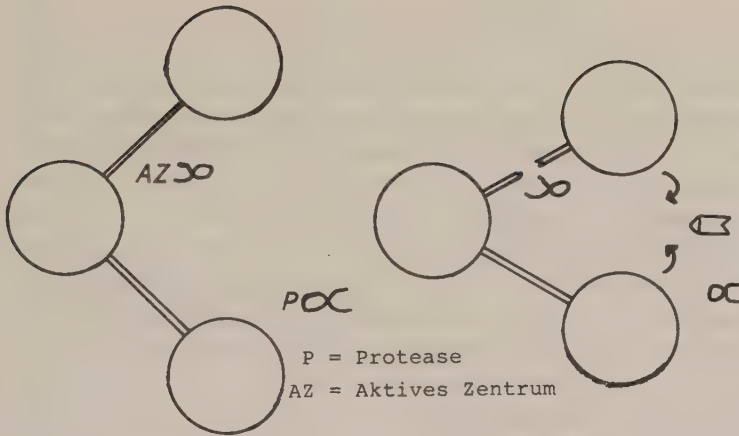


Abb. 1

Schematische Darstellung der α_2 M-Protease-Interaktion

Die Protease hydrolysiert eine oder mehrere Peptidbindungen des α_2 M. Darauf reagiert der PI mit einer Konformationsänderung: Die Protease ist quasi irreversibel wie in einer "Falle" gefangen, aus der sie nur noch durch denaturierende Reagenzien wieder befreit werden kann.

Die in Abb. 1 mit einem Pfeil  markierte "Falltür" läßt nurmehr relativ kleine Moleküle passieren: So Proteine, die weiterhin auch von der komplexierten Protease hydrolysiert werden können, aber auch manche PI'en, wie etwa Pankreas-Trypsin-Inhibitor, die den α_2 M-Protease-Komplex auf diese Weise noch hemmen können. Das molare Verhältnis α_2 M/Protease ist noch immer ungeklärt: HEIMBURGER (24) gibt dieses BARRET und STARKEY (7) folgend mit 1:1 an. BIETH (5) und GUSTAVSSON (16) sagen 1:2, und LASKOWSKY und KATO (42) halten es für möglich, daß α_2 M gar mehr als zwei Proteasen gleichzeitig binden kann. Das hieße für das α_2 M "multiheadedness". (Einen Inhibitor bezeichnet man dann als "multiheaded", wenn er über mehr als ein reaktives Zentrum verfügt (54).)

2.4.1.2. Die physiologische Funktion des α_2^M

Welch führende Rolle α_2^M im Stoffwechsel der Proteasen im Organismus spielt, zeigen verschiedene Versuche. So überlebten Versuchstiere nie, sobald all ihr α_2^M mit Protease gesättigt war (48). Weiter wurde festgestellt, daß zumindest die an α_1 PI gebundenen Proteasen auf freies α_2^M transferiert wurden.

α_2^M -Protease-Komplexe werden im retikuloendothelialen System äußerst rasch eliminiert.

Aus all dem folgt, daß α_2^M wahrscheinlich eine Schlüsselfunktion beim Schutz vor Autodigestion hat (48).

2.4.2. Der α_1 -Protease-Inhibitor

α_1 PI wird nach wie vor meist α_1 -Antitrypsin genannt. Seitdem man aber weiß, daß der α_1 PI ein breites Spektrum von Serumproteasen - neben Trypsin u.a. Chymotrypsin und Elastase - hemmt, erscheint dieser Name überholt (42).

2.4.2.1. Verschiedene Phänotypen

Mindestens 21 Phänotypen des α_1 PI lassen sich elektrophoretisch voneinander unterscheiden (41). Sie differieren im Polypeptidteil (36). Liegt die Z-Allele (normal M) homozygotisch vor, finden wir nur noch 20 Prozent der normalen α_1 PI-Konzentration im Serum. Andererseits läßt sich der Z-Inhibitor in seinem biologischen Verhalten nicht vom normalen α_1 PI unterscheiden.

Die zuerst von ERIKSSON (14) ermittelte Koinzidenz von genetisch determiniertem α_1 PI-Mangel und dem Lungenemphysem, gilt heute als gesichert. Auch zur Leberzirrhose im Kindesalter scheint α_1 PI-Mangel zu prädisponieren. Daher fordern inzwischen Pädiater bei jeder unklaren Zirrhose den Ausschluß eines solchen Mangels (51).

2.4.2.2. Stabilität

α_1 PI hat keine Disulfidbrücken (11). Dies mag erklären, warum verschiedene Untersucher (23, 40, 41) totalen Aktivitätsverlust

des α_1 PI nach Säureinkubation zeigen konnten: Bei pH 3,6, 4,0, bzw. 5,0 wohl abhängig von der Dauer der Säureeinwirkung. KÜPPERS (41) prüfte auch die Hitzelabilität: Nach Erwärmung auf 60°C fand er nach vier Stunden keine Aktivität des α_1 PI mehr. KRESS und LASKOWSKY (40) registrierten einen Aktivitätsverlust um ca. 10 Prozent nach einigen Tagen bei 4°C, bzw. nach vier Monaten bei -20°C.

2.4.2.3. Der Hemmechanismus

Er folgt zwar prinzipiell dem Standardmechanismus, auf eine Besonderheit muß hier aber eingegangen werden.

Nach MARTODAM und LIENER (45) verfügt der α_1 PI über zwei identische einander überlappende reaktive Zentren, die kompetitiv die Protease zu binden suchen. Diese Vorstellung läßt sich auch gut mit der Tatsache vereinen, daß ein Komplex zwischen α_1 PI und einer Protease keine andere Protease zu hemmen vermag (vgl. p. 7). Der α_1 PI ist somit zwar multiheaded, aber dennoch nicht in der Lage, zwei Proteasen gleichzeitig zu binden.

2.4.2.4. Physiologische Funktion des α_1 PI

Die Vorstellungen über die Rolle des α_1 PI im Organismus sind noch äußerst unvollkommen.

α_1 PI ist ein starker Inhibitor der Leukozytenelastase. Letztere ist ein Mediator bei Entzündungen, greift die Basalmembran der Zellen an und kann somit zum Wegbereiter des Lungenemphysems werden. Dies könnte die Prädisposition für diese Erkrankung beim α_1 PI-Mangel, auf die bereits hingewiesen wurde, erklären.

Während einer akuten Pankreatitisscheint α_1 PI einen nur sehr geringen Schutz vor den massiv freigesetzten Verdauungsfermenten bieten zu können (5). Einerseits reagiert der Inhibitor so langsam mit Trypsin, daß diesem hinreichend Zeit verbleibt, zahlreiche physiologische Substrate zu hydrolysieren. Andererseits wird die Ineffizienz durch das α_2 M potenziert: Innerhalb kürzester Zeit bindet α_2 M 75 Prozent des freigesetzten Trypsins und formt Komplexe, die enzymatisch aktiv sind.

Zwar kann Trasylol[®] auch die komplexierte Protease hemmen (s.p. 7), da jedoch die Proteasen ihre Wirkung innerhalb von Sekunden entfalten, erscheint der therapeutische Nutzen zumindest zweifelhaft.

TRAVIS (59) faßt die möglichen Funktionen des α_1 PI wie folgt zusammen: Aufgrund seines relativ niedrigen MG's (52 000) soll α_1 PI im Extrazellulärraum Proteasen komplexieren. Nach Wiedereintritt ins Plasma könnte dann die Protease vom α_2 M übernommen werden, woraufhin der neugeformte Komplex im retikuloendothelialen System phagozytiert wird. Die weitere Verstoffwechselung ist vorerst noch nicht geklärt.

2.4.3. Der Inter- α -Trypsin-Inhibitor

Der I α I hat ein MG von 160 000 und besteht infolge Genduplikation aus zwei Tandemdomains. Als Domain bezeichnet man den Polypeptidabschnitt eines Inhibitors, der für die Hemmeigenschaften des Inhibitors ausschlaggebend ist. Der I α I ist also doubleheaded. Vor Besprechung der Derivate sollen hier schon zwei wichtige Punkte herausgestrichen werden.

1. Alle säurestabilen humanen intravasalen PI'en, die wir kennen, lassen sich auf den I α I zurückführen.
2. I α I gilt als ein äußerst labiler Inhibitor, der spontan in Folgeprodukte zerfällt (22), die mit Antikörpern gegen I α I eine Kreuzreaktion aufweisen.

2.4.3.1. Die physiologischen Derivate des I α I

In der Tat fand man mehrere Inhibitoren, die immunologisch dem I α I verwandt sind. Sie sind in Tab. 1 auf p. 11 aufgelistet. Im Urin wurden zuerst von ASTRUP (2) Mingin und Minginin beschrieben. Die immunologische Kreuzreaktion dieser Inhibitoren mit I α I konnten OROCHSCH und NORDSCHOW (50) nachweisen. Heute weiß man, daß der immunologisch aktive Anteil des I α I als säurestabiler Inhibitor nicht nur im menschlichen Serum und Urin zu finden ist, sondern auch im Bronchial- und Nasensekret vorkommt (30).

Aus dem Überstand enteweißten Plasmas konnte HOCHSTRASSER (27) zwei weitere säurestabile Inhibitoren isolieren, die mit Antikörpern gegen I α I Präzipitate formen. Für die PI'en bestimmte er das MG mit 22 000 bzw. 44 000, was den Schluß nahelegt, daß der eine Inhibitor ein Dimer des anderen ist.

Auch der Ausschluß eines Artefakts infolge der Säureeinwirkung gelang: Die zwei Inhibitoren ließen sich auch im nativen Serum darstellen (27).

Derivate des I α I

<u>Urin</u>	<u>Plasma</u>
Hitze- und Säurestabil,	Plasmaüberstand nach
reich an Sialinsäure, MG = 16 000:	HClO ₄ : Zwei
Mingin;	säurestabile
arm an Sialinsäure:	Inhibitoren
Minginin	mit MG = 22 000,
	bzw. 44 000

Tab. 1. (nach HEIMBURGER (24))

2.4.3.2. Der physiologische Inhibitor HI-30 und seine "künstlichen" Derivate

Um das Verständnis für die folgenden Ausführungen zu erleichtern, sei auf Abb. 2 auf p. 12 verwiesen. Sie stellt schematisch die zunächst recht verwirrend anmutenden Beziehungen zwischen I α I und seinen Derivaten dar.

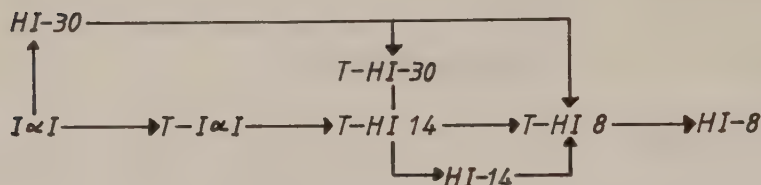
Unabhängig von den zuletzt beschriebenen Entdeckungen isolierte HOCHSTRASSER (32) aus Harn und Serum säurestabile Inhibitoren, deren Genese er mittels zweier Reaktionen erklärt:

1. Physiologisch limitierte Proteolyse des I α I

(mit Elastase? (12)).

2. Künstliche Proteolyse mit Trypsin.

Behandelt man den Inhibitor oder eines seiner Derivate mit Trypsin, entsteht ein Trypsin-Inhibitor-Komplex, aus dem man den Inhibitor nur mit denaturierenden Reagenzien (meist HClO_4) freisetzen kann. Hieraus folgt, daß Trypsin als Agens der physiologischen Proteolyse nicht in Frage kommt (33).



T-HI-30

T-HI-14

T-HI-8

T-IαI stehen hier für den mit Trypsin komplexierten Inhibitor

Abb. 2 (nach HOCHSTRASSER (34))

Während der HI-30 und HI-14 Komplexe mit Antikörpern gegen IαI bilden, zeigt der HI-8 keine derartige Kreuzreaktion (34). Antigenkomponenten und reaktives Zentrum eines Inhibitors müssen also keineswegs in ein und demselben Polypeptidabschnitt des Inhibitor-moleküls vertreten sein.

Verschiedene Untersuchungen HOCHSTRASSERS weisen den HI-8 jedoch zweifelsfrei als sogenannten "Minimalinhibitor" des IαI aus, d.h. als kleinstes Derivat mit dem reaktiven Zentrum des IαI (34).

Im HI-8 finden wir das gegenüber Trypsin aktive Domain vom Kunitz-Typ des HI-14 (61). Im HI-14 ist dieses Domain kovalent an ein zweites (= dem Tandemdomain des IαI) gebunden, welches sich gegenüber Trypsin, Chymotrypsin und Elastase als inaktiv erweist (60). Dennoch sollte man den IαI als doubleheaded bezeichnen und mit LASKOWSKY (42) vermuten, daß das scheinbar inaktive Domain gegenüber noch unbekannten Proteasen Aktivität besitzt.

2.4.3.3. Der I α I aus physio- und pathophysiologischer Sicht

In der Physiologie unterscheidet man heute zwei Typen von Inhibitoren (61):

1. Sekretionsinhibitoren mit einem MG von 6 000 bis 14 000. Diese sind säurestabil und können Zellwände penetrieren.
2. Extrazelluläre (intravasale und interstitielle) Inhibitoren mit einem MG von 60 000 bis 800 000.

Mit einem MG von 180 000 und äußerst geringer Konzentration in den Sekreten zeigt der I α I eher die Eigenschaften eines Inhibitors vom zweiten Typ. Der HI-30 jedoch - als ein Produkt der limitierten physiologischen Proteolyse des I α I - ist als ein Vertreter der ersten Kategorie anzusehen.

Der HI-30 wird glomerulär filtrierte, so daß wir ihn auch im Harn finden. Dieser Inhibitor könnte eines Tages eine Stütze der nephrologischen Diagnostik werden.

Die Konzentration des HI-30 in Harn und Serum wird bestimmt durch den I α I-Umsatz aufgrund der physiologischen Proteolyse und den Filtrationsdruck, den die Niere aufzubauen vermag. Bei Nephropathien stellte HOCHSTRASSER (26) fest, daß die HI-30-Konzentration im Serum in beinahe linearer Beziehung zur Kreatinin-Serum-Konzentration steht. Die Bestimmung der Serumkonzentration des HI-30 hat gegenüber der Kreatinin-Clearance den großen Vorteil, daß sie unabhängig von Urinsammelfehlern ist.

Auch Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantationen kann ein steiler Anstieg der Inhibitorkonzentration im Serum anzeigen (25).

2.4.4. Das α_1 -Antichymotrypsin

α_1 X hat ein MG von 68 000. Soweit man derzeit weiß, hemmt α_1 X ausschließlich Chymotrypsin (23).

2.4.5. Das Antithrombin III

AT III (MG = 65 000) ist der führende PI von Thrombin im Serum. Diese ansich recht langsame Reaktion wird durch Heparin erheblich beschleunigt (42). Man vermutet, daß es der AT III-Heparin-Komplex ist, welcher zu dieser weitaus schnelleren Reaktion mit Thrombin in der Lage ist. Dabei wird anscheinend AT III wieder frei, um weiter die Inhibitor-Enzymreaktion "katalysieren" zu können.

2.4.6. Der C₁-Inaktivator

C₁-INA (MG = 70 000) hemmt den Hageman-Faktor sowie dessen aktive Komponenten (24). Der Hageman-Faktor hat eine Triggerfunktion für Blutgerinnung und Fibrinolyse, Kallikrein- und Komplement-System. Daher kann C₁-INA allein durch Hemmung des Hageman-Faktors alle diese vier Enzymsysteme blockieren.

Der Mechanismus der Hemmung ist noch unklar, da einerseits der PI in der Reaktion allem Anschein nach nicht verbraucht wird, andererseits aber die aktiven Fragmente des Hageman-Faktors verschwinden (24).

2.4.7. Das α_2 -Antiplasmin

Einer der zuletzt entdeckten Inhibitoren des Humanserums ist das α_2 -Antiplasmin (42). Es hat ein MG von 70 000 und reagiert langsam mit manchen trypsinähnlichen Proteasen. Seine Reaktion mit Plasmin dahingegen verläuft äußerst schnell.

3. ERGEBNISSE

3.1. Einführung

Um Antworten auf die in der Einleitung (p. 1) herausgearbeiteten Fragen zu finden, wurde von folgenden Voraussetzungen ausgegangen:

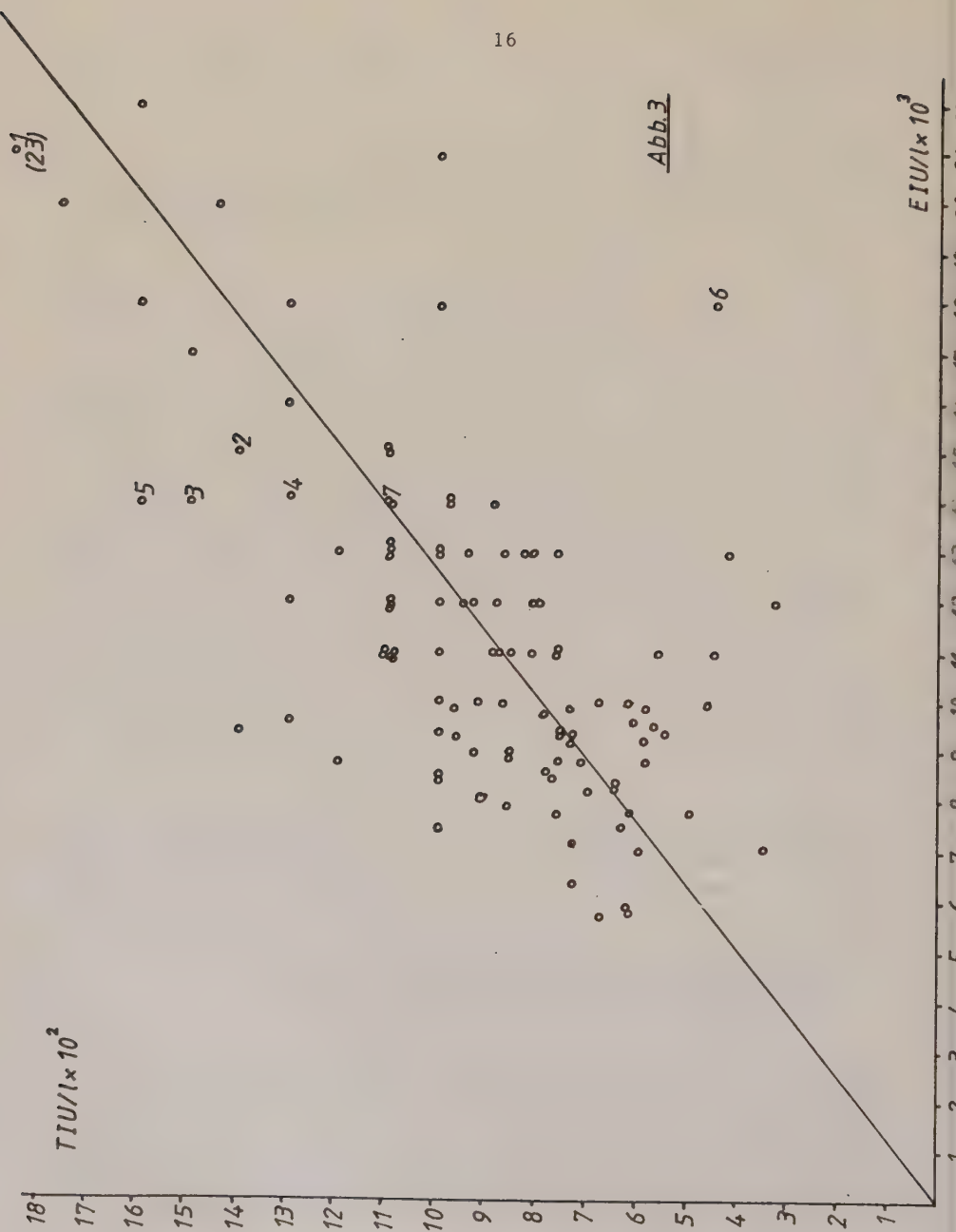
1. Mit α_1 PI-Antiserum läßt sich im nativen und enteiweißten Serum spezifisch die Konzentration des α_1 PI bestimmen.
2. Die Trypsinhemmung des nativen Serums ist in erster Linie auf α_1 PI zurückzuführen, die des enteiweißten Serums auf den HI-30.
3. Auch die Elastasehemmung des nativen Serums wird vor allem von der Konzentration des α_1 PI bestimmt.
4. Die Elastasehemmung des enteiweißten Serums muß nach Voraussetzung 1. dann dem α_1 PI zuzuschreiben sein, wenn hier Elastasehemmung und immunologisch bestimmte α_1 PI-Konzentration miteinander korrelieren.

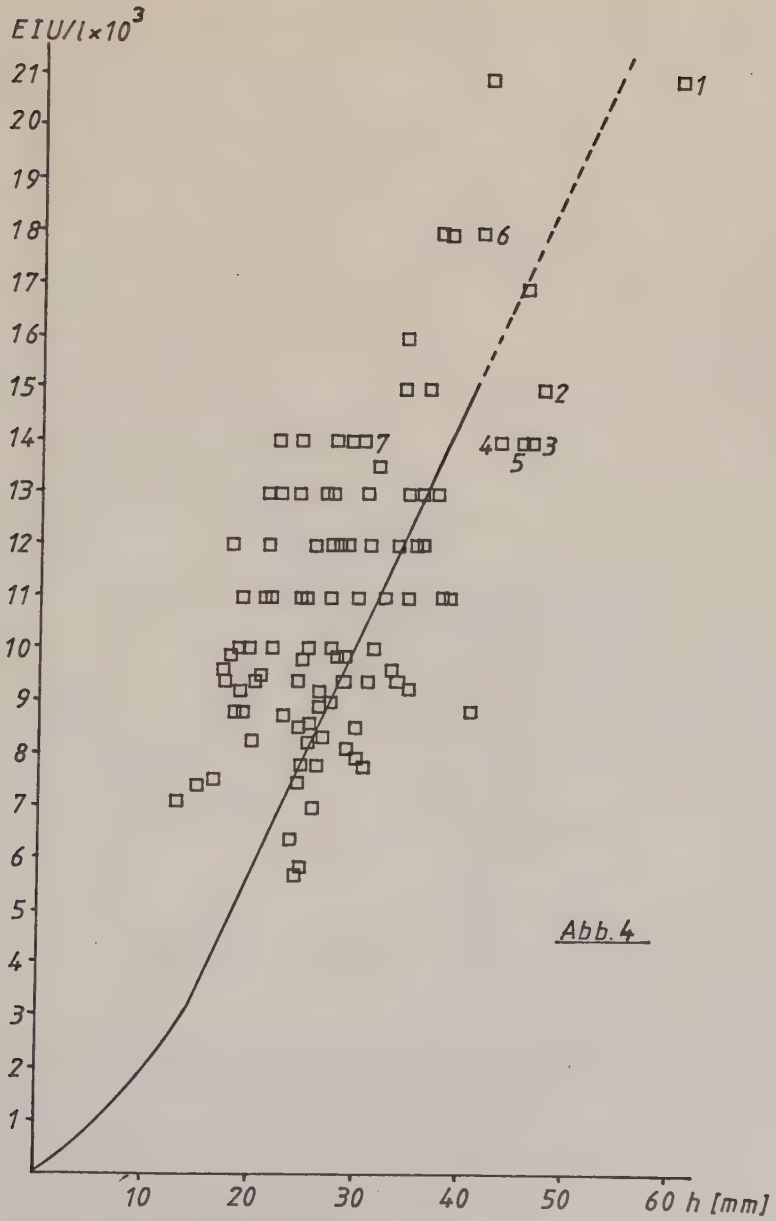
Da zur 4. Voraussetzung nur dann eine Aussage möglich ist, wenn die Untersuchungen die Voraussetzungen 2. und 3. bestätigen können, war die Bestimmung folgender Parameter, wie auf p. 46 ff. beschrieben, nötig:

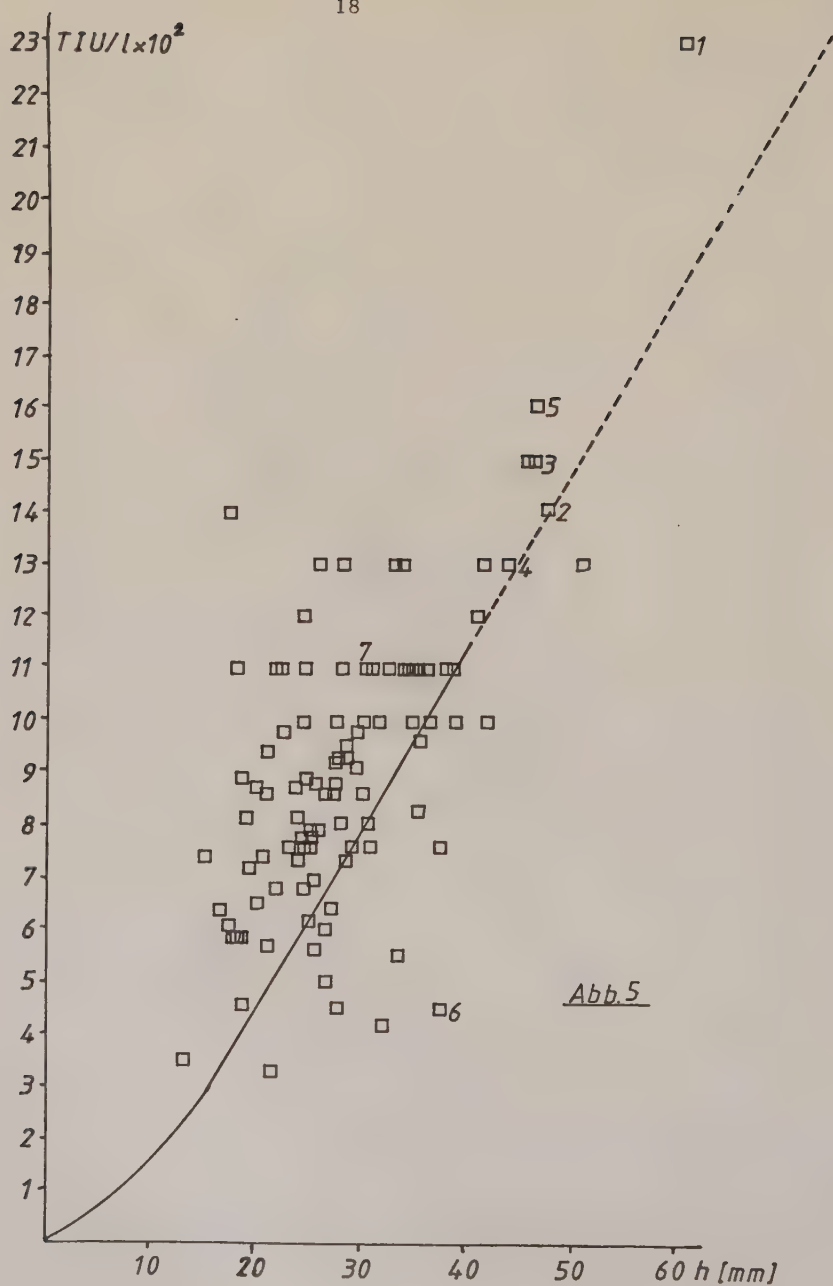
1. α_1 PI-Konzentration im nativen und enteiweißten Serum.
2. Trypsin- und Elastase-Hemmung der nativen und enteiweißten Seren.

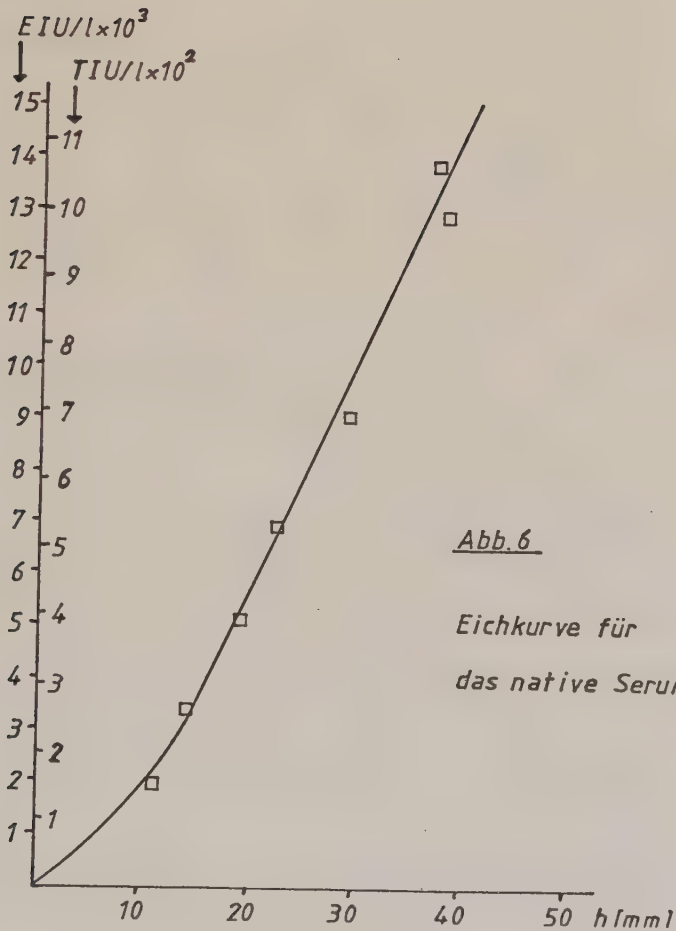
3.2. Zusammenfassung des Zahlenmaterials in Mittelwerten und Gegenüberstellung der Ergebnisse in Grafiken

In den folgenden Abbildungen wurden "beste" Geraden nur grafisch erstellt. Auch auf die Berechnung von Korrelationskoeffizienten wurde verzichtet, weil hier weniger deren absolute Werte interessieren, als vielmehr der Vergleich der Abbildungen untereinander. Um das zu vereinfachen, wurden für manche Relation der Seren (z. B. EIU/TIU) Mittelwert und Variationskoeffizient bestimmt.









Zu Abb. 6: Diese Kurve folgt aus sieben Verdünnungen eines Serums. EIU/l und TIU/l wurden dann einmal bestimmt und für die weiteren Punkte der Kurve berechnet. Die Exaktheit kann dann bei dem geringen Fehler auf die LAURELL'sche Methode nicht mehr verwundern. (Vgl. Abb. 10 auf p. 24)

3.2.1. Versuche mit dem nativen Serum

Der Trypsin- und Elastase-Hemmtest ergaben folgende SIA-Mittelwerte: $9\ 100 \pm 320$ TIU/l für den Trypsintest und

$12\ 000 \pm 3\ 400$ EIU/l für den Test mit Elastase.

Abb. 3 (p. 16) zeigt beim nativen Serum das Verhältnis Elastase-/Trypsinhemmung: Dabei ist $\bar{X}_{\text{EIU l}^{-1}}/\text{TIU/l}^{-1} = 13 \pm 5$ und VK = 38%. Die Punkte, die mit den Ziffern 1-7 markiert sind, fielen erstmals in Abb. 8 (p. 22) auf. Ihre Bedeutung wird in den Erläuterungen zu jener Abb. auf p. 25 und vor allem in der Diskussion der Ergebnisse (p. 33 ff.) eingehend erklärt.

In Abb. 4 und 5 (p. 17 und 18) wurden die inhibitorischen Aktivitäten der Seren gegen die entsprechenden standardisierten (s.p. 51 f.) Peakhöhen aufgetragen. In die Diagramme wurde die Eichkurve (Abb. 6, p. 19) eingetragen, die dort gestrichelt wurde, wo die Meßpunkte ihren Bereich verlassen.

Vor allem im Bereich höherer SIA finden wir die Werte dicht entlang der Eichkurve. Daraus folgt, daß die inhibitorische Aktivität gegenüber Trypsin und vor allem Elastase gut mit der immunologisch ermittelten $\alpha_1\text{PI}$ -Serumkonzentration korreliert.

3.2.2. Versuche mit dem enteiweißten Serum

In allen drei Testreihen - Trypsin- und Elastasetest sowie Immunelektrophorese - konnten säurestabile Inhibitoren nachgewiesen werden.

Die Überstand-IA gegenüber Trypsin beträgt im Mittel

$6,1 \pm 3,5$ TIU/l. Mit Elastase wurden 33 ± 23 EIU/l gefunden.

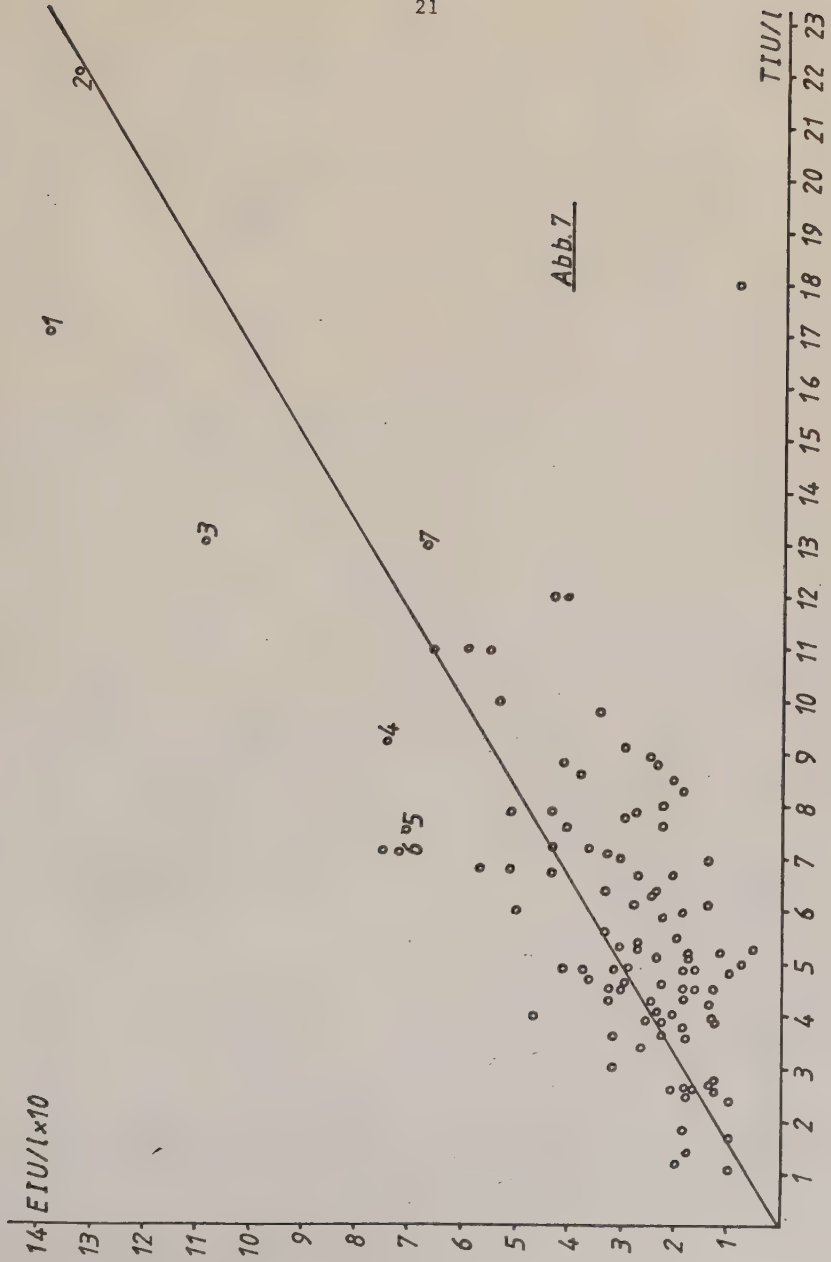
Abb. 7 (p. 21) zeigt den Zusammenhang zwischen Trypsin- und Elastase-Hemmung der enteiweißten Seren:

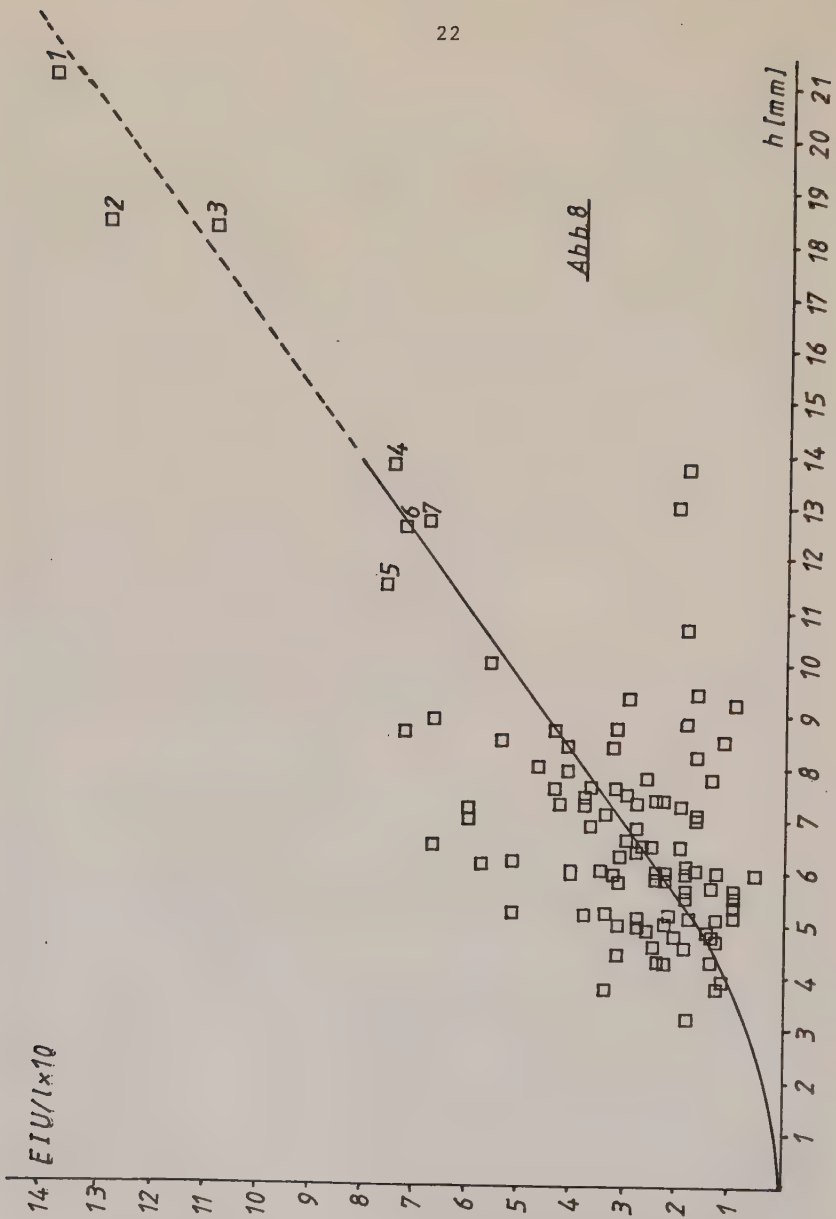
$$\bar{X}_{\text{EIU l}^{-1}}/\text{TIU l}^{-1} = 5,6 \pm 3,0 \text{ und VK} = 50\%.$$

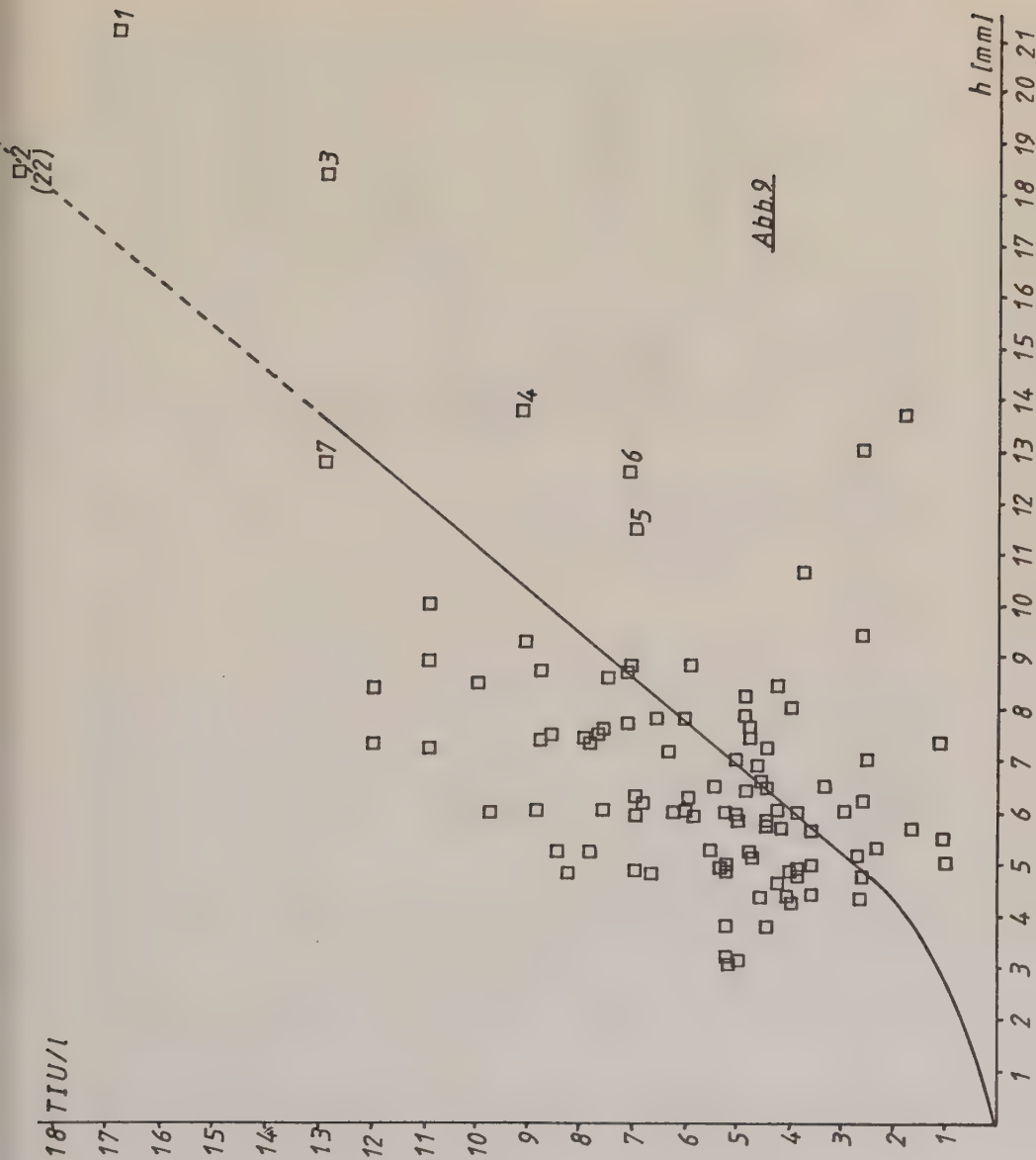
Dabei wird deutlich, daß die Korrelation zwischen den Werten mit steigender Aktivität zunimmt.

Abb. 8 und 9 (p. 22, 23) wurden analog Abb. 4 und 5 gezeichnet. Während in Abb. 9 keine Korrelation zu erkennen ist, imponiert in Abb. 8 eine deutliche Korrelation im Bereich oberhalb 70 EIU/l (Punkte 1-7). Bei diesen Überständen fällt weiterhin auf, daß für

(Fortsetzung p. 25)



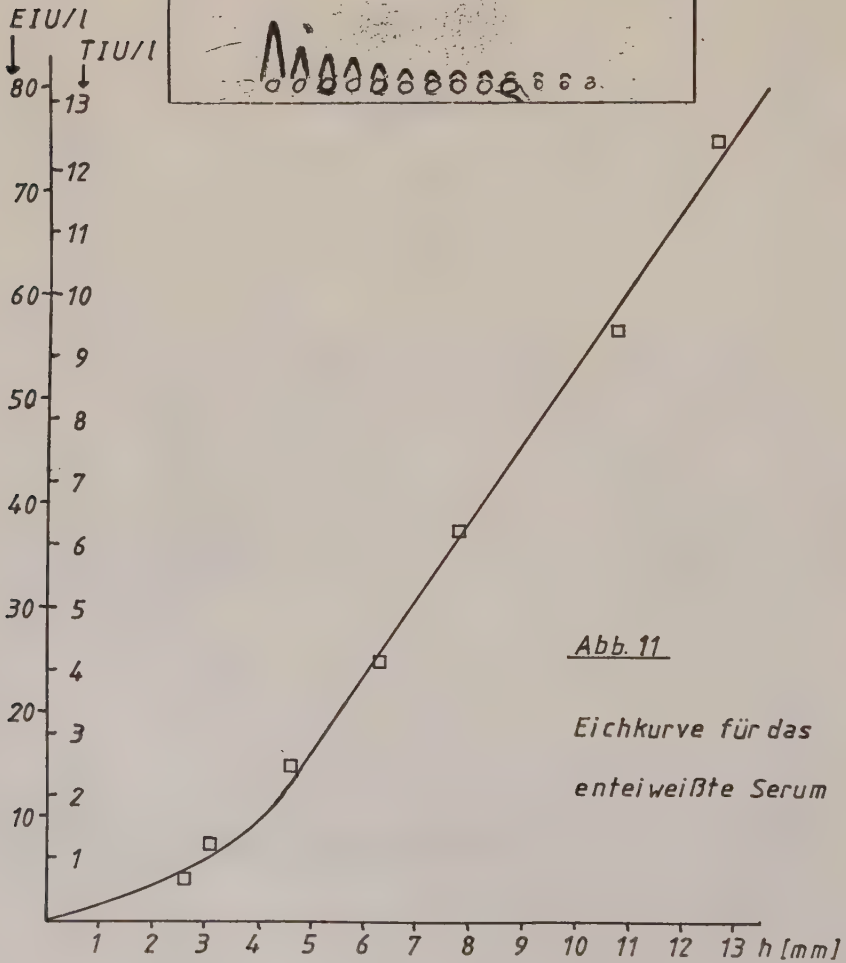




enteiweißtes Serum

1) 1:1	7) 1:10
2) 1:2	8) 1:12
3) 1:3	9) 1:15
4) 1:4	10) 1:15
5) 1:5	11) 1:18
6) 1:8	12) 1:20

Abb. 10



sie $\text{EIU l}^{-1}/\text{TIU l}^{-1}$ um 8,5 schwankt, d.h. deutlich größer ist als der Mittelwert (= 5,6).

Um dem Verhalten dieser Seren auch in den anderen Versuchsreihen nachgehen zu können, wurden die korrespondierenden Punkte in den weiteren Abbildungen markiert: Es sind fast ausnahmslos Werte oberhalb $\bar{X} + s$ oder gar $\bar{X} + 2s$.

Abb. 10 (p. 24) zeigt die Immunelektrophorese, die zu der Eichkurve (Abb. 11) führte. Diese Kurve wurde in Abb. 8 und 9 eingetragen.

3.2.3. Die InhibitorKonzentration vor und nach dem Denaturieren der Seren

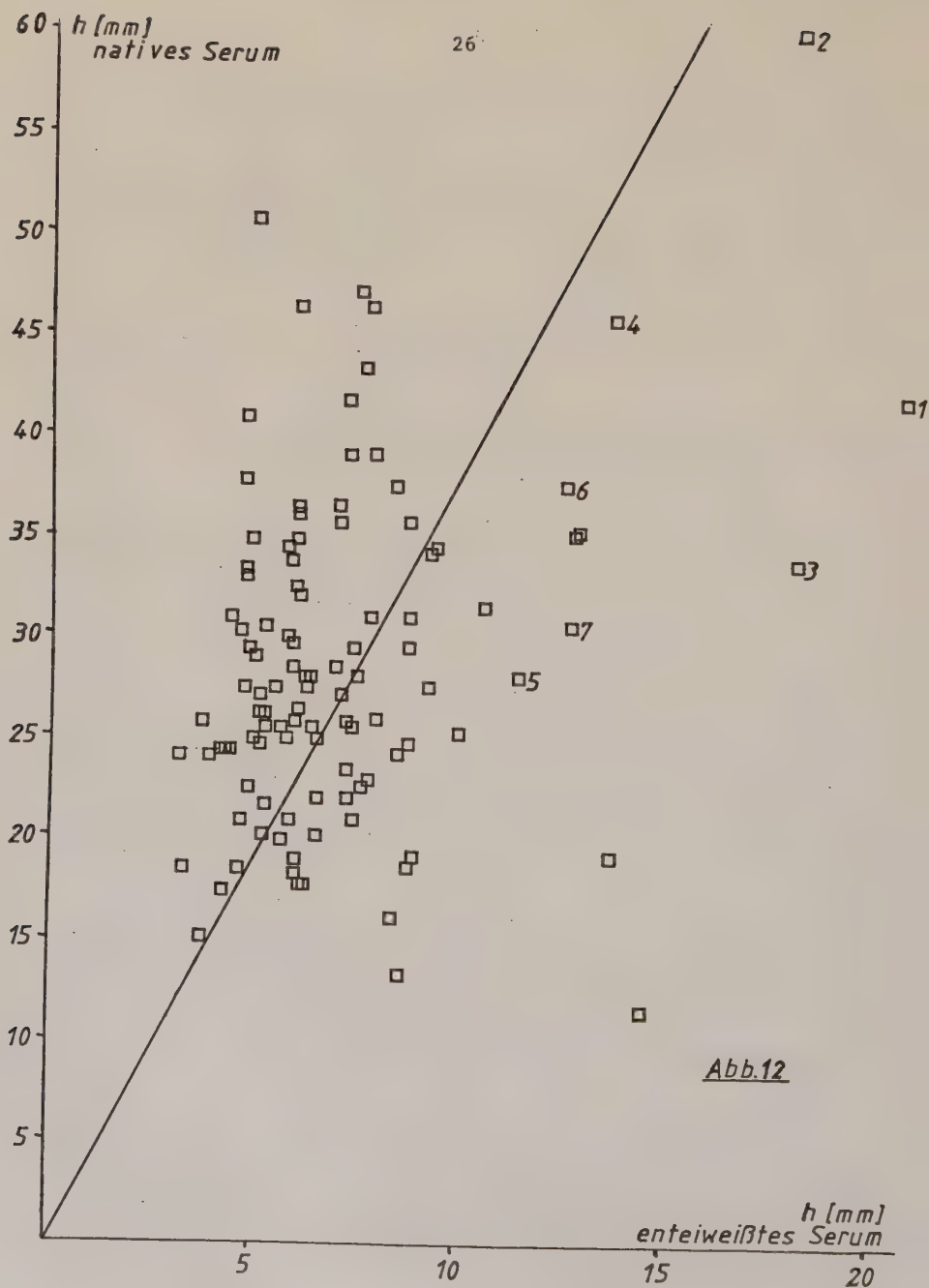
Der Einfluß des Enteiweißens auf die Hemmaktivität der Seren und auf deren nach LAURELL (45) ermittelten $\alpha_1\text{PI}$ -Konzentrationen wird aus den folgenden Zahlen und Abbildungen ersichtlich.

3.2.3.1. Die Immunelektrophorese

Nach dem Denaturieren der nativen Seren ergab sich eine 178-fach geringere Konzentration vom $\alpha_1\text{PI}$ der Proben, sprich der Überstände. In dieser Rechnung wurde die unterschiedliche Verdünnung und Einsatzmenge der Proben berücksichtigt. D.h. einmal 10 μl 1:20 verdünnten nativen Serums, dann 20 μl vom unverdünnten enteiweißten Serum.

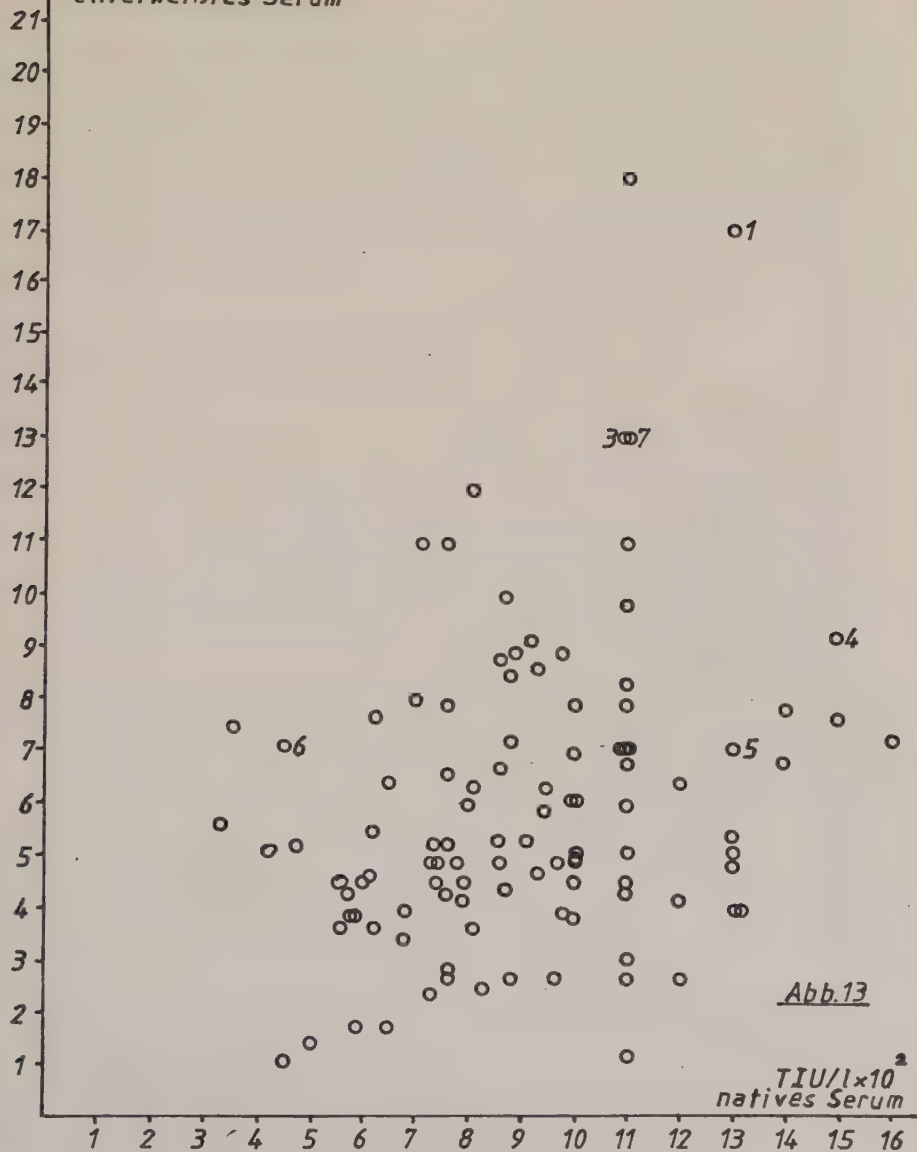
Abb. 12 (p. 26) zeigt das Ergebnis der Immunelektrophorese vor und nach dem Enteiweißen der Seren. Für den Mittelwert aus Peakhöhe (nativ) geteilt durch Peakhöhe (enteiweißt) - = 178 - wurde mit $s = 57$ ein VK von 32% errechnet. Die Werte scheinen also durchaus voneinander abhängig zu sein. (Vgl. z.B. Abb. 3, p. 16: VK = 38%)

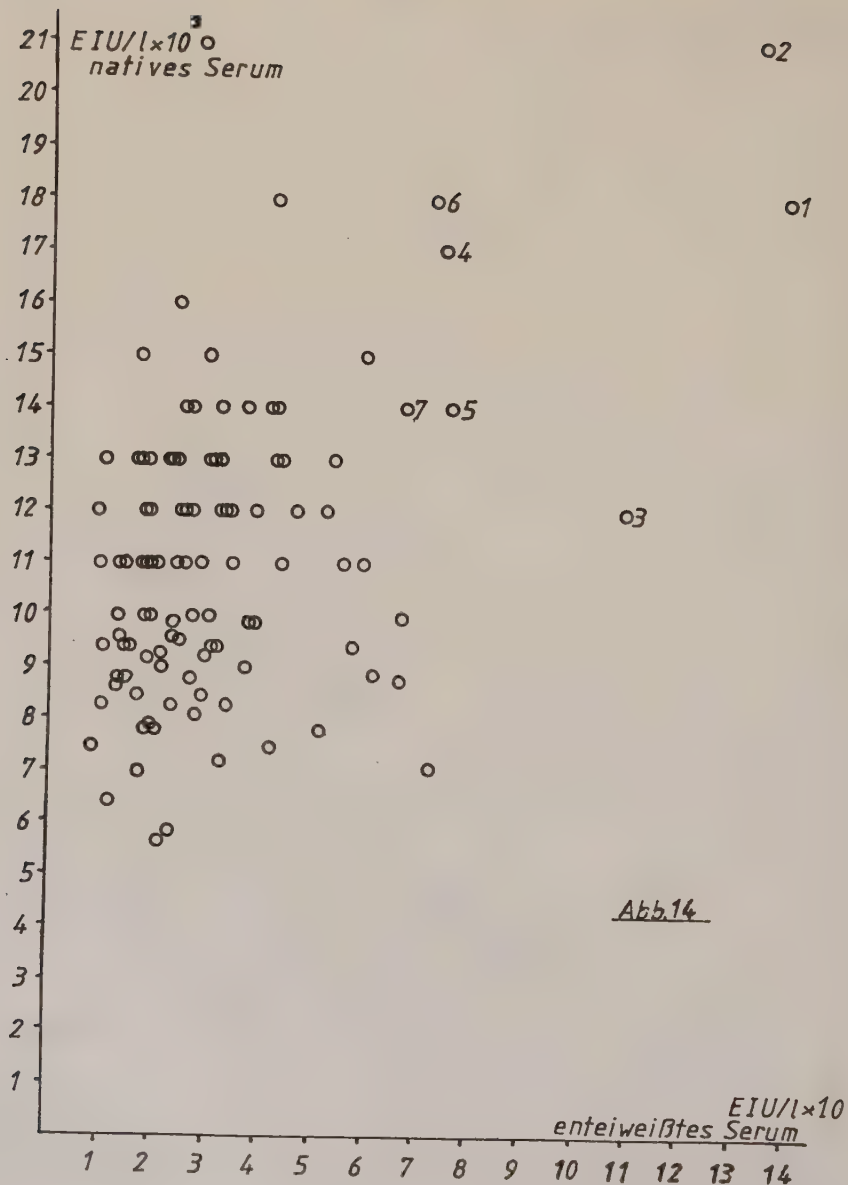
N.b. In diesem Abschnitt wurde der ungleiche Nullpunkt (verschiedene Lochgröße auf der Agarplatte und unterschiedliche Nachweisgrenzen) und der nicht identische Verlauf der Eichkurven für natives und enteiweißtes Serum vernachlässigt.



TIU/l
enteiweißtes Serum

02
(23)





3.2.3.2. Die Trypsinhemmung

Sie verringert sich infolge des Enteiweißens um den Faktor 184:

$$\bar{X}_{\text{TIU l}^{-1}(\text{nativ})/\text{TIU l}^{-1}(\text{enteiweißt})} = 184 \pm 114, \text{VK} = 55\%.$$

Abb. 13 (p. 27) kann man wohl nurmehr als Punktwolke bezeichnen, obwohl auffällt, daß sehr hohe TIU/l des denaturierten Serums auch hohe Werte beim nativen Serum ergeben. Umgekehrt ist das für zahlreiche Punkte im unteren rechten Bereich der Kurve nicht der Fall.

3.2.3.3. Die Elastasehemmung

Siehe Abb. 14 (p. 28)!

$$\bar{X}_{\text{EIU l}^{-1}(\text{nativ})/\text{EIU l}^{-1}(\text{enteiweißt})} = 465 \pm 254, \text{VK} = 62\%.$$

Auch hier also die IA der enteiweißten Seren völlig unabhängig von der IA ihrer nativen Vorgänger.

Allein für Seren, die nach dem Enteiweißen EIU/l größer 80 bieten ($\bar{X} + 2s = 79$ EIU/l), gilt das nicht: Bei diesen ist stets auch die Elastasehemmung vor Enteiweißen überdurchschnittlich.

Die obigen drei Kriterien des Verlustes an IA der Seren durch das Enteiweißen korrelieren in keiner Weise untereinander. D.h. ein sehr starker Rückgang z.B. der elastasehemmenden Aktivität eines Serums ist keinesfalls immer begleitet von einem gleich großen Verlust an Trypsinhemmung oder an $\alpha_1\text{PI}$ -Konzentration.

3.2.3.4. Tatsächliche und erwartete inhibitorische Aktivität der enteiweißten Seren

Dieser Abschnitt gibt Antwort auf die folgende Frage:

Bestätigen Trypsin- und Elastasehemmtest die IA der Überstände, die man erwarten muß, wenn man die Peaks der enteiweißten Proben mit denen der nativen vergleicht?

Zunächst sei der etwas komplizierte Weg der Berechnung, der aus einer Kombination aller sechs Testreihen (Trypsin- und Elastase-

Hemmtest und Immunelektrophorese für natives und enteweißtes Serum) folgt, erklärt.

Man beachte, daß auch hier die Vereinfachung, wie auf p. 25 unter n.b. aufgeführt, gilt!

Dann wurde davon ausgehend, daß zwischen elastase- und trypsin-hemmender Aktivität und α_1 PI-Konzentration (bestimmt nach LAURELL) im nativen Serum eine weitgehend lineare Beziehung besteht, wie folgt gemittelt:

370 EIU l^{-1} und 28 TIU l^{-1} entsprechen 1 mm Peakhöhe in der Immunelektrophorese.

Da in Elektrophorese 40 mal soviel enteweißtes wie natives Serum zum Einsatz kommt, muß man diese Werte durch 40 teilen, um vergleichen zu können. Dann folgt:

1 mm Peakhöhe entsprechen 9,3 EIU l^{-1} , bzw. 0,7 TIU l^{-1} .

Hier ein Rechenbeispiel zu Abb. 15 und 16 (p. 31 f.):

Ein Peak eines enteweißten Serums mißt 3,9 mm.

Das läßt $3,9 \text{ mm} \times 9,3 \text{ EIU } l^{-1}/\text{mm} = 36,0 \text{ EIU } l^{-1}$

und $3,9 \text{ mm} \times 0,7 \text{ TIU } l^{-1}/\text{mm} = 2,7 \text{ TIU } l^{-1}$ erwarten.

Die Hemmtests aber ergeben:

12 EIU l^{-1} und 5,2 TIU l^{-1}

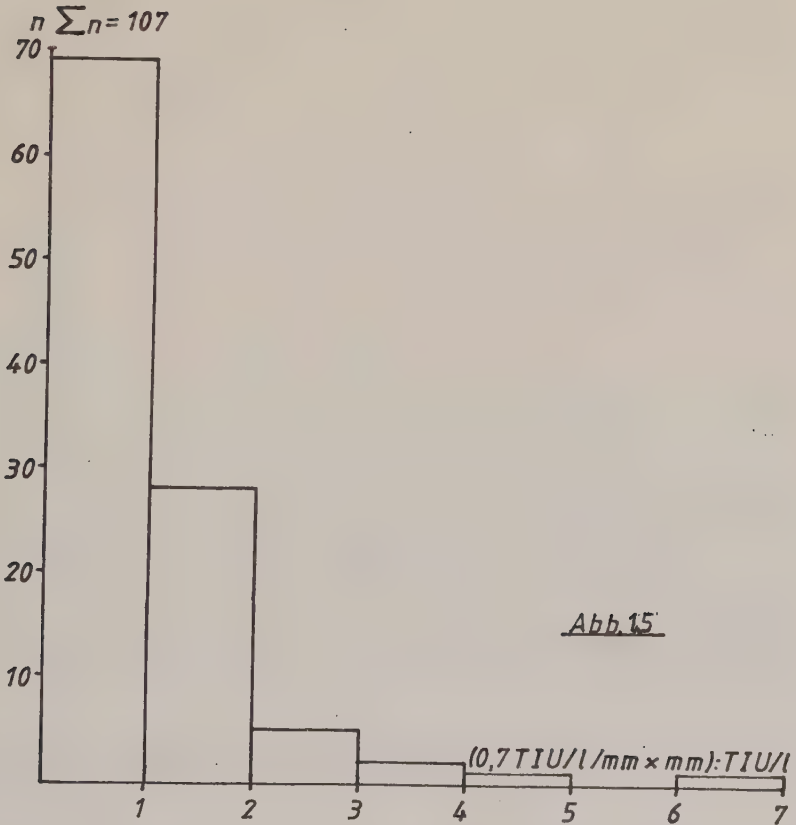
Daraus folgt:

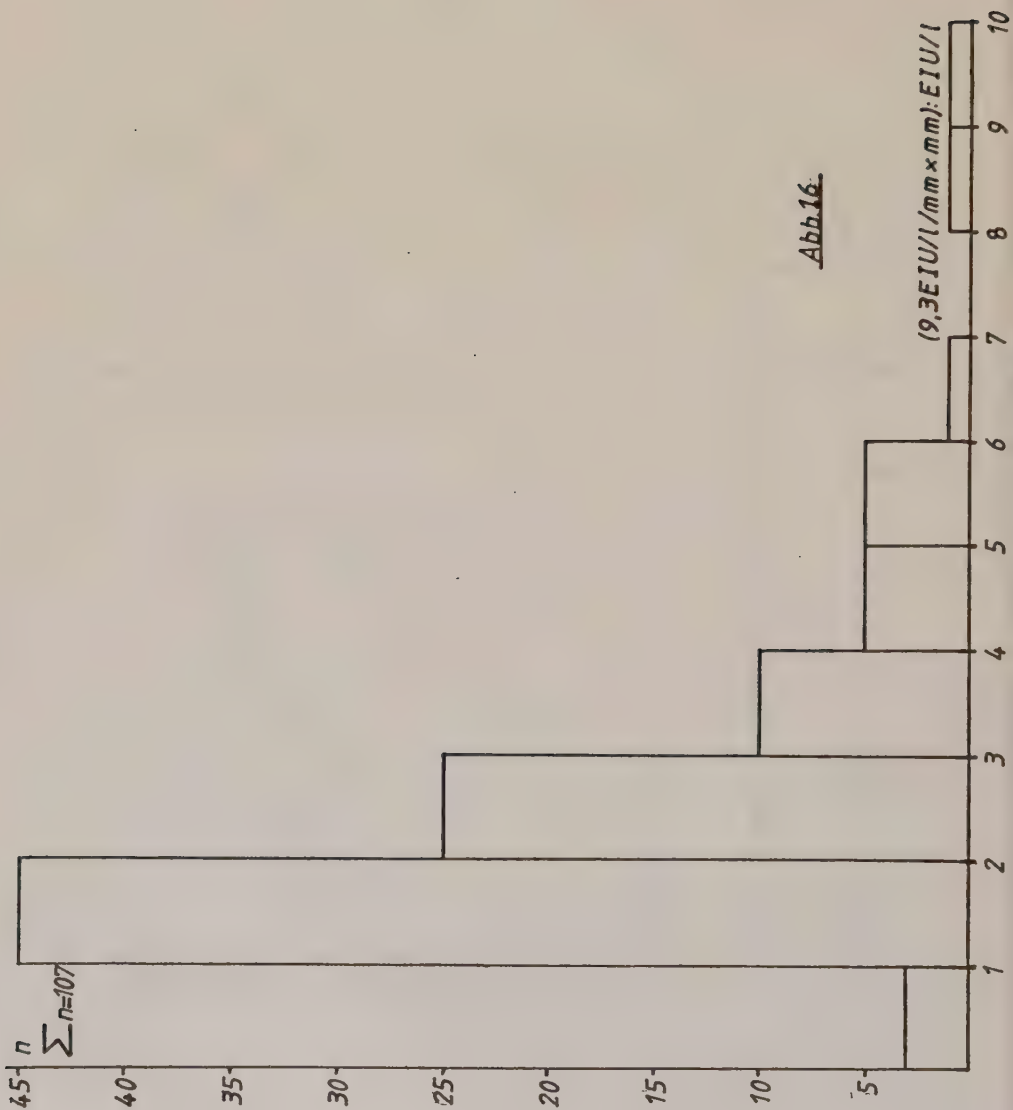
EIU l^{-1} (erwartet)/EIU l^{-1} (gemessen) = $36 : 12 = \underline{3,0}$ und

TIU l^{-1} (erwartet)/TIU l^{-1} (gemessen) = $2,7 : 5,2 = \underline{0,5}$.

Diese letzten Brüche sind in Abb. 15 und 16 in Form zweier Histogramme dargestellt.

Es zeigt sich, daß 64 Prozent aller enteweißten Seren höhere TIU l^{-1} als erwartet haben. Andererseits haben 97 Prozent der Seren niedrigere EIU l^{-1} als es deren α_1 PI-Gehalt erwarten ließe.





4. DISKUSSION

Erinnern wir uns zunächst wieder an die einleitende Fragestellung: Was hätten die Experimente zeigen sollen, um Anhaltspunkte für eine Säurestabilität des α_1 PI zu liefern? Oder aber: Können wir im enteiweißten Serum die Verhältnisse wiederfinden, die den α_1 PI in den Versuchen mit den nativen Seren kennzeichnen?

4.1. Trypsin- bzw. Elastasehemmung und α_1 PI-Konzentration im nativen Serum

Die Versuche mit dem nativen Serum ergaben:

1. Eine Korrelation zwischen den enzymatischen Hemmtests und der Immunelektrophorese, die sich im Falle der Elastasehemmung als enger erwies (s. Abb. 4 und 5 auf p. 17 f.).
2. Etwa 13 mal mehr EIU l^{-1} als TIU l^{-1} .

Diese Resultate lassen sich leicht erklären:

α_1 PI und α_2 M sind die dominierenden Elastaseinhibitoren des menschlichen Serums (16). Dabei beträgt die molare Konzentration des α_2 M ca. 4-10% der des α_1 PI. Aber selbst ein noch höherer Anteil könnte den Elastasehemmtest kaum stören, da auch an α_2 M gebundene Elastase zu einem großen Teil noch Suc-(Ala)₃-Nan hydrolysieren kann (4). (Vgl. Hemmechanismus auf p. 6 f.)

Trypsin wird neben α_1 PI auch von α_2 M, I α I und AT III gehemmt. Die molare Konzentration der letzten drei Inhibitoren macht ungefähr 14 Prozent der α_1 PI-Serumkonzentration aus (38), was die Korrelation in Abb. 5 nicht unerheblich stört.

4.2. Trypsinhemmung und Immunelektrophorese der enteiweißten Seren

Wir fanden im enteiweißten Serum eine Elastasehemmung, die nur noch das 5,6-fache der Trypsinhemmung beträgt, bzw. nur 0,2% der ursprünglichen Elastasehemmung und 0,5% der Trypsinhemmung des nativen Serums. Dabei ergab sich keine Korrelation zwischen den Aktivitäten der nativen und enteiweißten Seren (s. Abb. 13,

p. 27).

Diese Zahlen erklären sich zwanglos, denkt man an die schon lang bekannte säurestabile Trypsinhemmung der Spaltprodukte des $\alpha_1\text{PI}$ (s.p. 10 ff.), die auch das Bild in Abb. 5 (p. 18) und 9 (p. 23) bestimmen: Während im nativen Serum die $\alpha_1\text{PI}$ -Konzentration weniger als 5 Prozent aller Trypsininhibitoren ausmacht, sind seine Spaltprodukte die führenden Trypsinhemmer im denaturierten Serum. KÜPPERS (41) fand, daß der $\alpha_1\text{PI}$ unter Säureeinwirkung seine inhibitorische Potenz gegenüber Trypsin und Elastase in gleichem Maße einbüßt. Dies erscheint auch einleuchtend, geht man von einem gemeinsamen reaktiven Zentrum des Inhibitors für Trypsin und Elastase aus (4). Schon bei pH 3,6 fand er keine Aktivität des $\alpha_1\text{PI}$ mehr. Dabei gab er für diesen pH noch 10-20% der ursprünglichen Aktivität des Serums an.

Für die Versuche dieser Arbeit würde das bedeuten, weil während des Enteiweißens mit Sicherheit pH 0 vorlag, daß im Überstand allein HI-30 registriert wurde. Mit dieser Vorstellung harmonierte auch Abb. 15 (p. 31), die deutlich mehr Trypsinhemmung des enteiweißten Serums anzeigt, als es die Immunelektrophorese, die allein $\alpha_1\text{PI}$ erfassen sollte, erwarten ließe.

Freilich heißt das auch, daß uns jetzt die Betrachtung des Verhältnisses Elastase-/Trypsinhemmung bei der Identifizierung evtl. säurestabilen $\alpha_1\text{PI}$'s nicht mehr weiter hilft. Es sei denn, man wollte spekulieren, daß von den 0-8 TIU 1^{-1} , die HOCHSTRASSER (26) für den Serumüberstand als Normalwerte angibt, etwas Aktivität aufs Konto eines säurestabilen Anteils des $\alpha_1\text{PI}$ ginge.

Gehen wir einmal davon aus, es gäbe einen solchen Anteil, wieviel sollte er dann zur inhibitorischen Aktivität des Überstandes gegenüber Trypsin beitragen?

Die Rechnung ist einfach unter der Voraussetzung, daß die EIU 1^{-1} im Überstand der $\alpha_1\text{PI}$ -Konzentration der enteiweißten Proben entsprechen - was freilich fraglich ist. Der Mittelwert der säurestabilen Elastasehemmung ist 33 EIU 1^{-1} , und für die nativen Seren gilt, daß die IA gegenüber Elastase 13 mal höhere Werte liefern als gegenüber Trypsin. D.h. wir erhalten theoretisch

$$33 : 13 = 2,5 \text{ TIU } 1^{-1},$$

die auf säurestabilen $\alpha_1\text{PI}$ zurückzuführen wären.

Mit den gemachten Experimenten läßt sich diese Überlegung in der Tat nicht ausschließen, aber deren Richtigkeit auch keineswegs beweisen.

Zudem weist uns Abb. 9 (p. 23) noch eine andere Richtung. Dort sieht man, daß die Immunelektrophorese für Seren besonders hoher säurestabiler trypsinhemmender IA einen hohen Gehalt an α_1 PI anzeigt. Da diese Proben zugleich eine starke Nativhemmung von Trypsin aufweisen, sollte man bei der Überstand-IA dann vielleicht eher von einer Restaktivität sprechen. Im nächsten Abschnitt wird darauf noch näher eingegangen.

4.3. Elastasehemmung und Immunelektrophorese der enteiweißten Seren

Abb. 16 (p. 32) zeigt, daß die Peaks der Immunelektrophorese weitaus mehr Hemmaktivität gegenüber Elastase indizieren als sich tatsächlich finden läßt.

Nun ist bekannt, daß manche extravaskuläre Flüssigkeiten α_1 PI enthalten, der inhibitorisch inaktiv, dessen Antigen-Determinanten aber erhalten sind (6). Auch das Verhalten des HI-8 zeigt uns, daß Hemmaktivität und die Ergebnisse immunologischer Verfahren nicht immer aneinander gekoppelt sein müssen (s.p. 12). Sollte das auch für den mit Säure behandelten α_1 PI gelten, dann wäre dieses Phänomen bei der stets gleichen Behandlung der Seren überall - im Rahmen der Fehlergrenzen - in etwa gleichem Ausmaß zu erwarten. Wie Abb. 8 (p. 22) jedoch zeigt, ist das nicht der Fall: Die Grafik zeigt keine Korrelation zwischen immunologischem und elastasehemmendem Verhalten der Überstände.

Wie schon im Ergebnisteil angeführt, müssen wir bei dieser Feststellung einige Ausnahmen berücksichtigen. Diese werden alle von Seren gebildet, die sehr hohe IA gegenüber Elastase besitzen, d. h. deren säurestabile EIU l^{-1} grösser als Mittelwert plus einfacher oder doppelter Standardabweichung.

In 4.2. wurde bereits vermutet, daß hohe Überstandaktivitäten als Rest-IA zu interpretieren seien, d.h. daß während der Säureinkubation nicht all der α_1 PI im nativen Serum inaktiviert wurde. Diese Annahme bestätigen auch Abb. 4 (p. 17) und 8 (p. 22), die

eine gute Korrelation zwischen den EIU l^{-1} und den Höhen der Peaks der Immunelektrophorese für jene hochaktiven Seren (Punkte 1-7) zeigen.

4.3.1. Die säurestabile Elastasehemmung

Abb. 14 (p. 28) läßt keine Korrelation der IA gegenüber Elastase zwischen nativen und enteiweißten Seren erkennen. (Auf die Ausnahmen wurde mehrfach hingewiesen.)

Zu dieser Tatsache folgender Gedanke: An der Elastasehemmung des denaturierten Serums könnte neben der oben skizzierten Resthemmung nicht inaktivierten α_1 PI's noch (mindestens) ein weiterer Elastaseinhibitor beteiligt sein.

Von den bekannten Inhibitoren des Humanserums hemmt neben dem α_1 PI allein α_2 M Elastase. Eine Säurestabilität dieses Inhibitors ist freilich nicht zu erwarten: Wie schon in der Einleitung auf p. 6 beschrieben, werden die 4 Polypeptidketten des α_2 M mit HClO_4 zu zwei Paaren denaturiert.

Auch an evtl. im nativen Serum komplexierten α_1 PI ist zu denken. Jedoch erscheint es unwahrscheinlich, daß die Säure den Inhibitor aus dem Komplex lösen sollte, ohne ihn zu zerstören.

Zudem ließen die physiologischerweise im Blut vorkommenden Proteasen rein zahlenmäßig einen solchen Mechanismus keine große Rolle spielen. Während sich Trypsin im Blut bisher überhaupt nicht nachweisen ließ, fand man im Serum ca. 135 ng Granulozyten- und 60 ng Pankreas-Elastase pro ml Serum (8, 50). Und diese Proteasen sind auch zu 90 Prozent an den α_1 PI gebunden. Aber die knapp 200 ng/ml entsprechen (MG von Elastase = 25 000) 8,0 nMol pro Liter. Dahingegen finden wir 54 μ Mol α_1 PI in einem Liter Serum, bzw. 54×10^3 nMol/l (23). Dabei entspricht dieses Verhältnis von 1 : 7 000 durchaus dem Schutzbedürfnis des Organismus' gegenüber einer erhöhten proteolytischen Aktivität im Serum (zur Problematik dieses Schutzes s.p. 9 f.).

Was hier aber dargelegt werden sollte, ist, daß dieser minimale Anteil von 8 nMol α_1 PI pro Liter, der dann vielleicht im Überstand dekomplexiert vorliegen würde, mit Sicherheit in den hier durchgeführten Tests nicht nachzuweisen gewesen wäre.

Die 8 nMol entsprechen ca. $1,5 \text{ EIU l}^{-1}$. Das sind 4,5% des Mittelwertes der säurestabilen Elastasehemmung von 33 EIU l^{-1} . Der VK für den Elastasehemmtest der enteiweißten Proben beträgt jedoch 9,1%!

Um an obige Überlegung anzuknüpfen: Alle Resultate lassen die Existenz weiterer Elastaseinhibitoren vermuten. RABAUD (53) kam zu demselben Schluß.

Er untersuchte die SIA gegenüber Elastase bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen. Dabei fand er auch in seiner Kontrollgruppe keine Korrelation zwischen der SIA und dem immunologisch ermittelten Gehalt an $\alpha_1\text{PI}$ und $\alpha_2\text{M}$ der Seren. Zugleich beobachtete er in der Elektrophorese der Seren der an Arteriosklerose erkrankten Probanden mindestens zwei Proteine, die sich von $\alpha_1\text{PI}$ und dem $\alpha_2\text{M}$ unterschieden.

Auch die Untersuchungen von GUSTAVSSON, OHLSSON und OLSSON (16) lassen Spielraum bei dem Verdacht auf "neue" Elastaseinhibitoren: Mit I^{125} radioaktiv markierte Elastase wurde nach Reaktion mit Humanserum nicht zu 100% an $\alpha_1\text{PI}$ und $\alpha_2\text{M}$ gebunden wiedergefunden.

Die Testreihen dieser Arbeit ergaben den Nachweis erhaltener $\alpha_1\text{PI}$ -Antigen-Determinanten im Überstand der enteiweißten Seren und eine Elastasehemmung, die deutlich niedriger war, als man es nach den Ergebnissen der Immunelektrophorese mit Antikörpern gegen $\alpha_1\text{PI}$ erwarten mußte.

Infolgedessen erscheint es berechtigt, die Elastasehemmung der denaturierten Seren anderen Inhibitoren zuzuschreiben.

Gehen wir dabei von einer Säurelabilität des $\alpha_1\text{PI}$ aus, können das die Ergebnisse anderer Untersuchungen nur stützen (s. Einleitung p. 8 f.).

Den Ausschluß eines künstlichen Inhibitors, geschaffen durch die Säureeinwirkung auf die Seren, konnten die hier gemachten Versuche nicht erbringen. Dafür müßte man den "neuen" Inhibitor aus dem Überstand und dann vor allem auch aus dem nativen Serum isolieren.

5. EXPERIMENTELLER TEIL

Mit zwei enzymatischen Hemmtests wurde die Konzentration von Trypsin- und Elastaseinhibitoren im nativen und enteiweißten Serum bestimmt. Mit beiden Tests wird im nativen Serum in erster Linie der α_1 PI erfaßt (38, 39).

Zudem wurde die Konzentration des α_1 PI wiederum im nativen und enteiweißten Serum mit der Immunelektrophorese nach LAURELL (44) ermittelt.

5.1. Fehlerrechnung

Anfängliche Probleme mit dem Elastase-Hemmtest - schlechte Reproduzierbarkeit der SIA in mehreren Serien mit einem Serum - veranlaßten zu folgenden Schritten:

1. Standardisierung des Tests. wie auf p. 47 f. beschrieben.
2. Ausdehnung der Fehlerbestimmung auf alle Versuche.

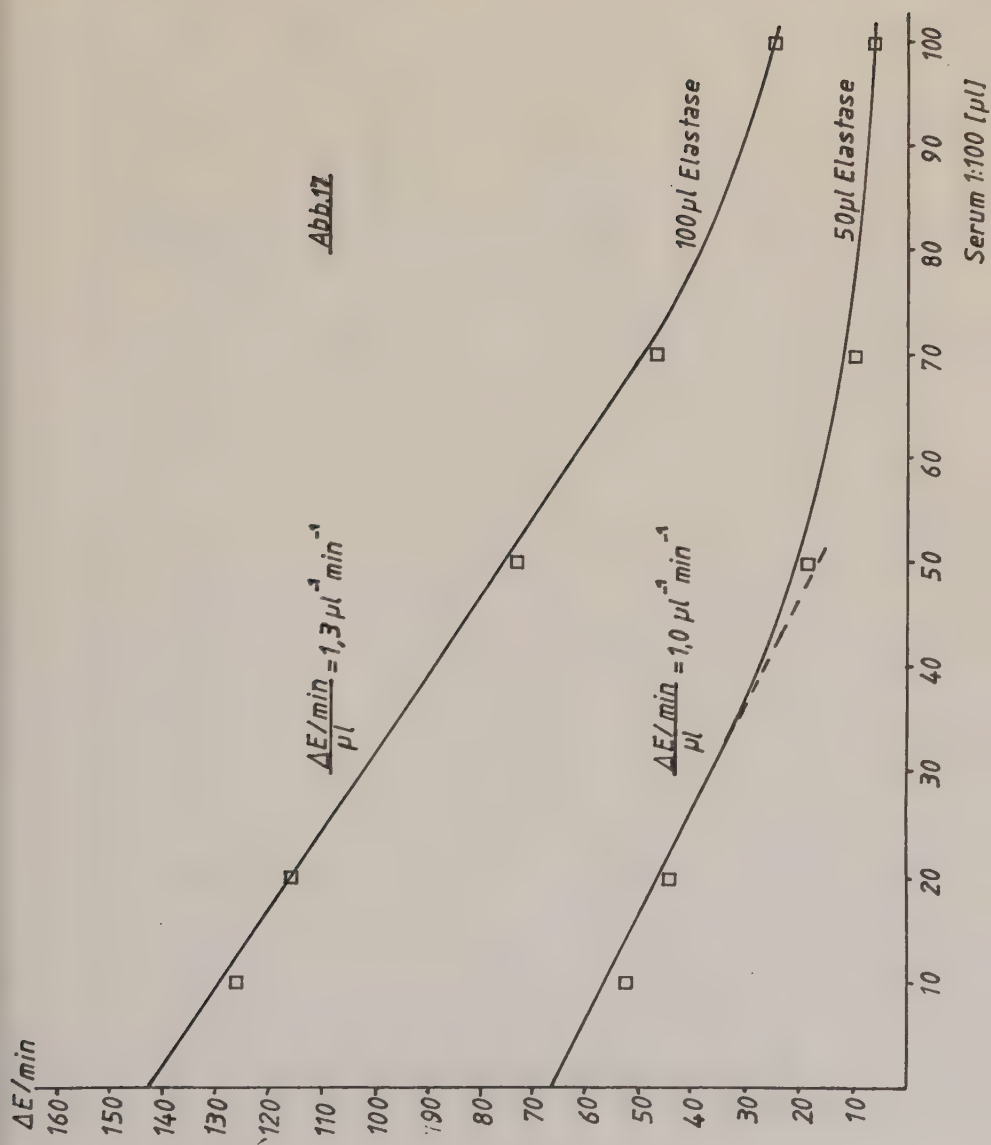
Abb. 17-19 (p. 39 ff.) mögen die Problematik beim Elastase-Hemmtest erläutern. Aufgetragen ist die Extinktionszunahme pro Minute ($\Delta E/\text{min}$) des Ansatzes gegen die eingesetzte Serummenge (in μl 1:100 verdünnten Serums) bei jeweils gleicher Substratkonzentration. Anhand solcher Kurven wurde dann im linearen Bereich graphisch $\Delta E \times \text{min}^{-1}/\text{ml}$ Serum ermittelt.

Es leuchtet ein, daß die Exaktheit dieser Werte mit der Anzahl der im linearen Bereich liegenden Meßpunkte zunimmt. Und wie die Kurven zeigen, ist eben jener lineare Abschnitt der Kurve desto länger, je mehr Elastase sich im Ansatz befindet.

Abb. 17 veranschaulicht, was passiert, wenn man die Länge des linearen Teils der Kurve überschätzt. Die untere Kurve ist so flach geraten, daß der Fehler auf $\Delta E \times \text{min}^{-1}/\text{ml}$ Serum gegenüber dem Wert, der sich aus der oberen Kurve ergibt, 30% beträgt.

Die Hemmkurven der Abb. 17-19 wurden mit Serum erstellt, das 18 000 EIU/l enthielt. Dabei bleibt die Kurve beim Einsatz von 100 μl Elastase bis zu ca. 0,7 μl Serum (= 70 μl Serum 1:100) linear. Die meist geringeren Aktivitäten ($\bar{X} = 11\,900$ EIU/l) gaben die Sicherheit, den Test mit 10, 20 und 50 μl 1:100 verdünnten

(Fortsetzung p. 44)



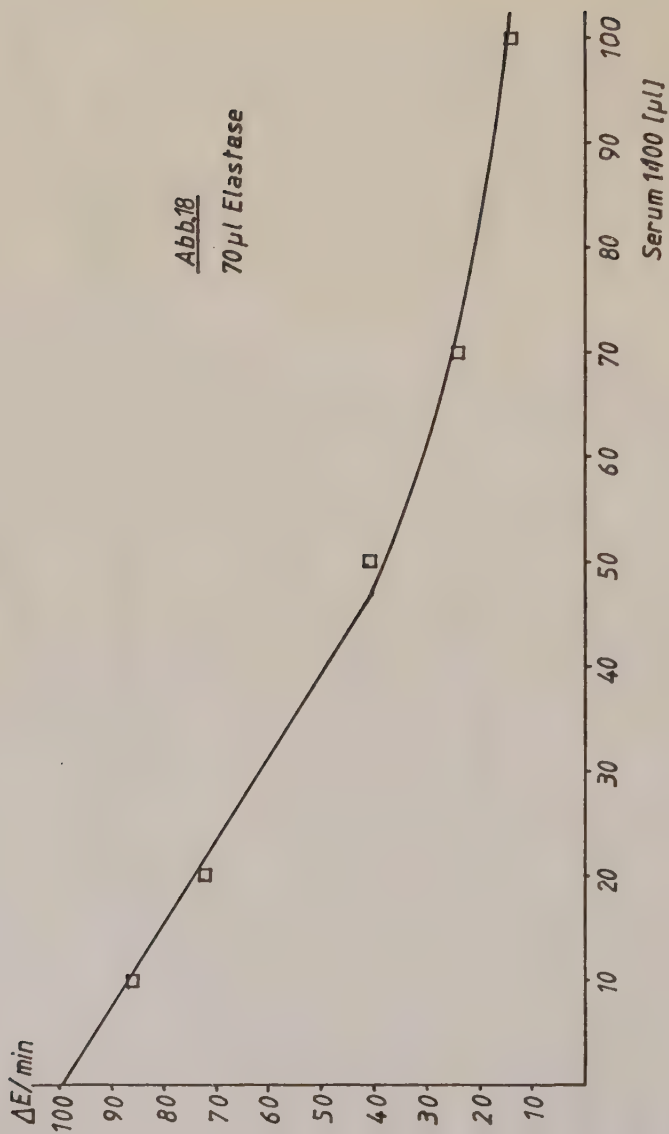


Abb. 19
100 μ l Elastase

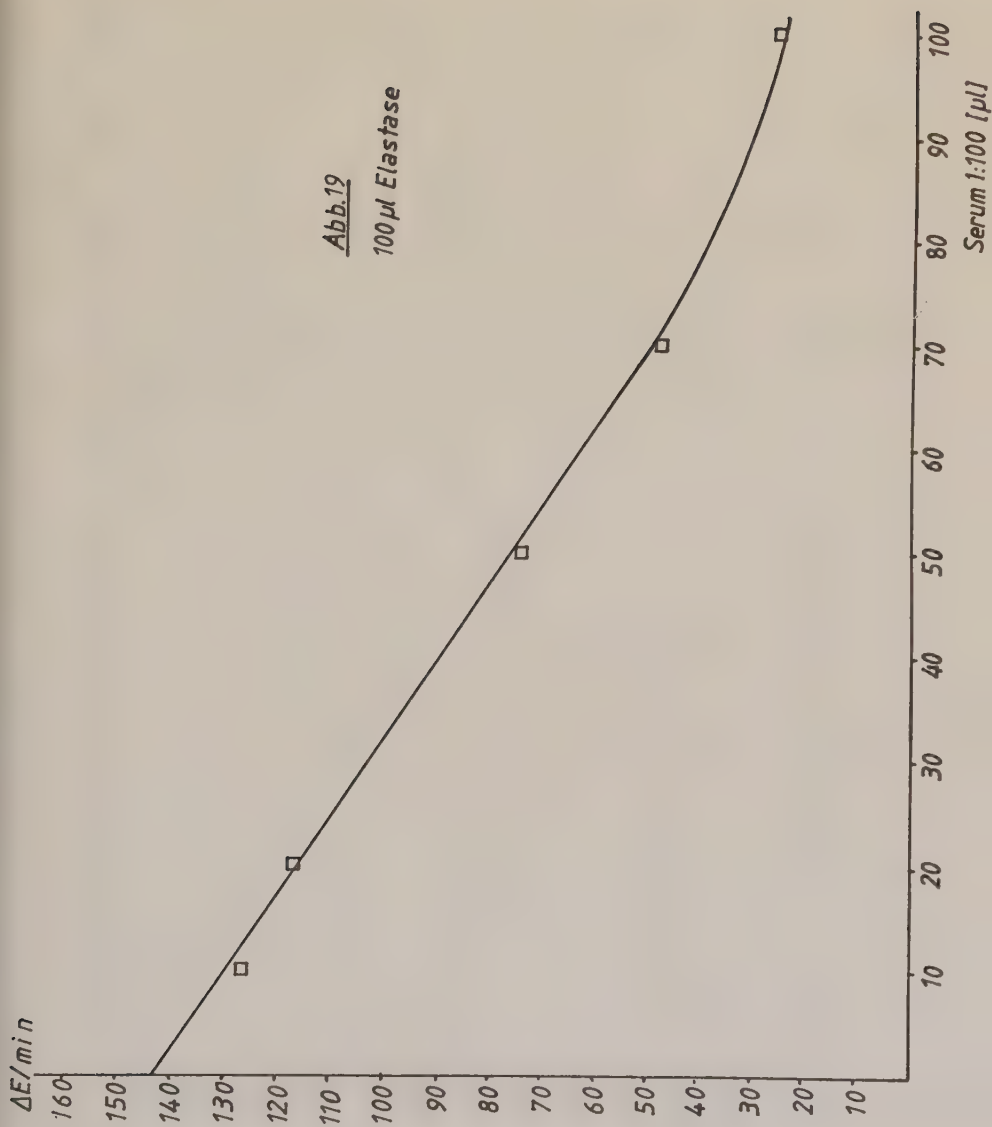
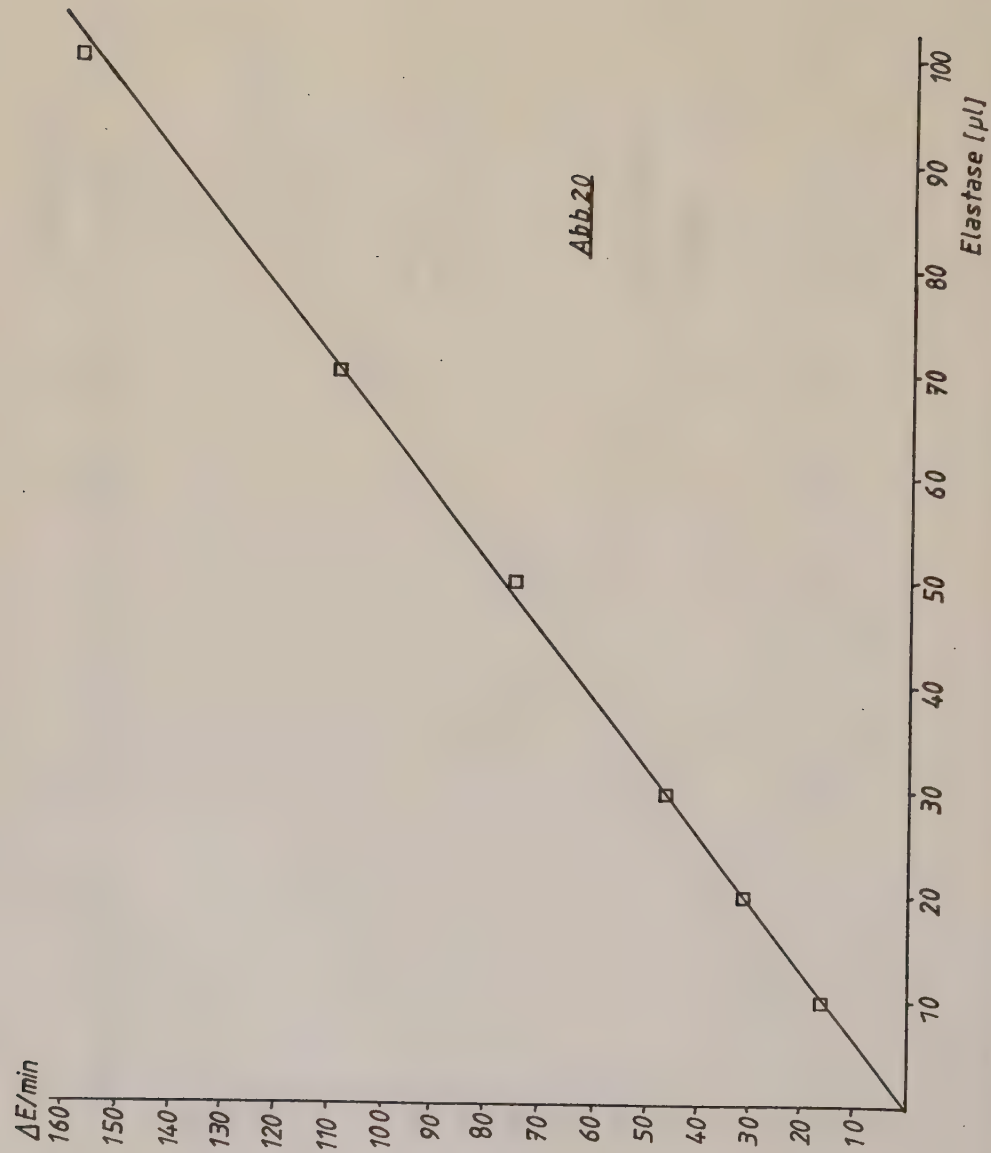
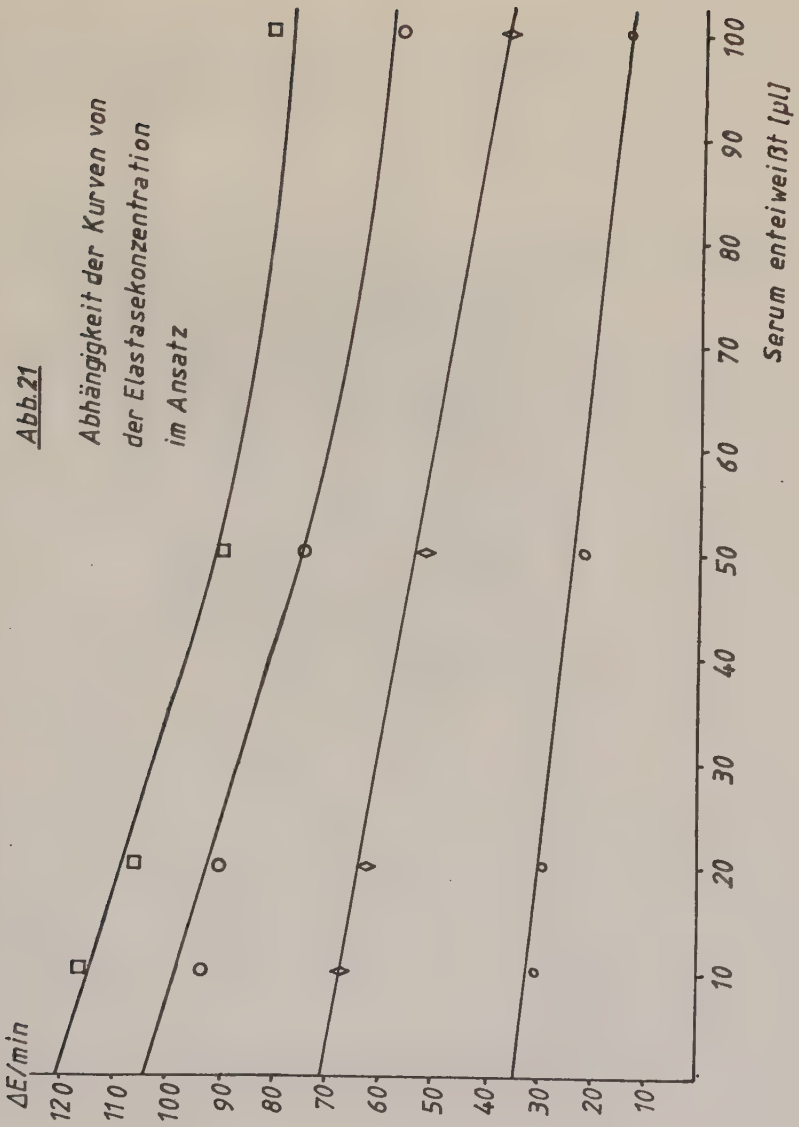


Abb 20



Serums optimieren zu können.

Die ursprüngliche Annahme, das Substrat $\text{Suc-(Ala)}_3\text{-Nan}$ läge mit 300 μl pro Ansatz nicht im Überschuß vor, widerlegt Abb. 20 (p. 42): Die Extinktion des Ansatzes Elastase + $\text{Suc-(Ala)}_3\text{-Nan}$ nimmt mit steigenden Elastasemengen linear zu.

Aus Abb. 21 (p. 43) wird ersichtlich, daß der Hemmtest mit dem enteiweißten Serum die gleichen Schwierigkeiten bereitete: Nur die oberen beiden Kurven verlaufen in ihrem linearen Abschnitt parallel.

Der Serumüberstand, der zu Abb. 21 führte, enthielt 62 EIU/l. Das ist vergleichsweise viel bei einem Mittelwert von nur 33 EIU/l. So wurden 20, 50 und 100 μl des unverdünnten enteiweißten Serums eingesetzt. Um aber bei hohen Aktivitäten die Inhibitorkonzentration nicht mit Werten, die bereits im flachen Teil der Kurve liegen, zu berechnen, wurde in solchen Fällen das $\Delta\text{E/min}$ beim Einsatz von 100 μl vernachlässigt.

Schließlich erwies sich die Elastaselösung als sehr instabil (Autoproteolyse?). So wurde laufend anhand des Leerwerts kontrolliert, ob sich noch ausreichend aktive Elastase im Ansatz befand. Dabei wurde der Leerwert stets zwischen 120 und 140 $\Delta\text{E/min}$ gehalten, was Abb. 17-19 und 21 nahelegen.

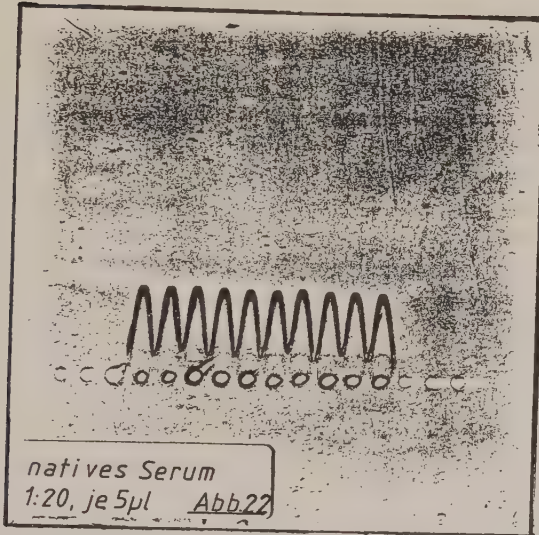
Um die Präzision der Versuche zu überprüfen, wurde jeweils die Standardabweichung bestimmt.

Ein natives Serum wurde in zehn Ansätzen 1:100 verdünnt und mit jedem Ansatz der Elastase- und der Trypsinhemmttest durchgeführt. Zehn 1:20-Verdünnungen führten zu zehn Peaks in der Immunelektrophorese (Abb. 22, p. 45). Zudem wurde das Serum in zehn Portionen enteiweißt und mit den Überständen in Hemmtests und Immunelektrophorese weitergearbeitet.

Die Berechnung der Variationkoeffizienten aus Tab. 2 (p. 45) ist anhand Abb. 22 für die Immunelektrophorese mit dem nativen Serum exemplarisch dargestellt.

	Serum	
	nativ	enteiweißt
Elastase- hemmttest	7,0%	9,1%
Trypsin- hemmttest	7,9%	6,6%
Immun- elpho	1,6%	8,8%

Tab. 2



X (mm)	$X - \bar{X}$ (mm)	$(X - \bar{X})^2$ (mm) ²	n = 10
17,9	0,4	0,16	
17,8	0,3	0,09	
17,8	0,3	0,09	
17,4	-0,1	0,01	
17,5	0,0	0,0	
17,5	0,0	0,0	
17,5	0,0	0,0	
17,4	-0,1	0,01	
17,2	-0,3	0,09	
<u>17,0</u>	-0,5	<u>0,25</u>	
175,0		0,7	

$$\bar{X} = 175 : 10 = 17,5 \text{ mm}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{(n-1)}} = \sqrt{\frac{0,7}{9}} = 0,3 \text{ mm}$$

$$VK = \frac{s}{\bar{X}} = \frac{0,3}{17,5} = \underline{\underline{1,6\%}}$$

Die Variationskoeffizienten, wie in Tab. 2 angegeben, ließen es nicht sinnvoll erscheinen, in den Resultaten der Experimente mehr als zwei Ziffern anzugeben. Also z.B. nicht 12 375, sondern 12 000 EIU/l. Einzige Ausnahme: Die auf 1/10 mm genaue Ablesung, die die PEAK SCALE LUPE erlaubt, wurde bei den Peaks der nativen Seren auch dann nicht gerundet, wenn sie die Höhe von 10 mm überschritten. Wurde doch der VK von 1,6% für $\bar{X} = 17,5$ mm bestimmt. LAURELL (44) gibt für Peaks zwischen 20 und 50 mm einen relativen Fehler von 1,85% an.

Hier sei nur am Rande vermerkt, daß die Fehler auf aus den Experimenten rechnerisch erstellte Werte mit zunehmender Komplexität der Rechnung natürlich größer werden. Schon bei der Angabe der Peakhöhe in Standardeinheiten (s.p. 51) addieren sich - wenigstens annähernd - die Variationskoeffizienten des maximalen Standards, des Standards auf der Platte des zu korrigierenden Meßwertes und schließlich des Meßwerts selbst.

5.2. Die Serumverdünnung

Für den Test mit dem nativen Serum wurde 1:100 mit aqua dest. verdünnt. Das enteweißte Serum wurde nicht verdünnt.

5.3. Das Enteweißen

Um die säurelabilen Inhibitoren zu eliminieren, wurden 2,5 ml Serum mit 250 μ l 70%iger Perchlorsäure versetzt. Nach 30minütiger Inkubation wurde der Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand im Eisbad mit 5 N KOH neutralisiert. Dabei fällt $KClO_4$ aus. Nach erneutem Zentrifugieren diente der verbleibende Überstand für die weiteren Versuche.

5.4. Die Hemmtests

5.4.1. Das Prinzip

Trypsin setzt aus B_2 -Arg-Nan, Elastase aus Suc-(Ala)₃-Nan einen Farbstoff, das gelbe p-Nitroanilin, frei. Diese proteolytische

Aktivität geht mit einer Extinktionszunahme des Ansatzes einher, die sich mit dem Photometer bei 405 nm verfolgen läßt.

Gibt man nun einen Inhibitor hinzu, wird dieser die Protease hemmen, und die Extinktionszunahme verläuft langsamer.

In dem Bereich, in dem die Geschwindigkeit der Extinktionszunahme linear umgekehrt proportional der eingesetzten Inhibitormenge ist, erlaubt das LAMBERT-BEER'sche Gesetz, die Aktivität des Inhibitors in Internationalen Einheiten (international units, U) zu berechnen. 1 U ist die Enzymmenge, die unter definierten Bedingungen in einer Minute ein Mol Substrat umsetzt.

5.4.2. Der Trypsin-Hemmtest

5.4.2.1. Die Reagenzien

5.4.2.1.1. Vorbereitung des TRA-Puffers

7,6 g Triäthanolamin, 15 ml HCl (2,0 M) und 2 g Äthylen-diamin-tetraacetat-Diantriumsals werden mit aqua dest. auf 1 000 ml aufgefüllt.

5.4.2.1.2. Vorbereitung des Trypsins

2,5 mg Trypsin auf 50 ml HCl ($2,5 \cdot 10^{-3}$ M). Lagerung bei 4°C.

5.4.2.1.3. Vorbereitung des B_2 -Arg-Nan

1 g B_2 -Arg-Nan auf 1 ml aqua dest.

5.4.2.2. Ansatz und Durchführung

Für den Test wurden vier Küvetten für jeweils einen Leerwert und drei Proben, wie aus folgender Tabelle ersichtlich, gefüllt.

200 μ l Trypsin
 1 000 μ l B₂-Arg-Nan
 x_{0-3} μ l 1:100 verd. Serum, bzw. unverd. Überstand
1 800 - x_{0-3} μ l TRA
 3,0 ml Küvetteninhalt

Tab. 3

Dabei gilt: Leerwert: $x_0 = 0 \mu$ l
 Probe 1: $x_1 = 100 \mu$ l (200 μ l)
 Probe 2: $x_2 = 200 \mu$ l (300 μ l)
 Probe 3: $x_3 = 300 \mu$ l (400 μ l)

Die in Klammern gesetzten Werte beziehen sich auf das enteiweißte Serum, d.h. den Überstand.

Durch Küvettenwechsel und Mischen des Ansatzes ergibt sich eine Inkubationszeit von 1-2 Minuten, nach der der Lösung B₂-Arg-Nan zugesetzt wird. Dann wird bei 25°C und 405 nm nach 1,2 und 3 Minuten die Extinktion gemessen. Aus den drei Meßwerten sowie dem Nullwert - ohne Serum, bzw. Überstand - wurde die Inhibitorkonzentration graphisch ermittelt.

5.4.3. Der Elastase-Hemmtest

5.4.3.1. Die Reagenzien (soweit nicht schon beim Trypsintest beschrieben)

5.4.3.1.1. Vorbereitung der Elastase

Stammlösung: 1 mg Elastase auf 1 ml TRA.

Diese Lösung wurde bei 4°C gelagert und für den Ansatz mit TRA-Puffer 1:100 verdünnt.

5.4.3.1.2. Vorbereitung des Suc-(Ala)₃-Nan

270 mg Suc-(Ala)₃-Nan auf 100 ml TRA und 100 ml aqua dest.
 Lagerung bei 18°C.

5.4.3.2. Ansatz und Durchführung

Beim Elastasetest wird mit Mikroküvetten gearbeitet, deren Füllung Tab. 4 analog der Vorangehenden zeigt.

100 μ l Elastase	
300 μ l Suc-(Ala) ₃ -Nan	
x_{0-3} μ l 1:100 verd. Serum, bzw. unverd. Überstand	
$\frac{600 - x_{0-3}}{1,0}$ μ l TRA	
1,0 ml Küvetteninhalt	Tab..4

Dabei gilt: Leerwert: $x_0 = 0 \mu$ l
 Probe 1: $x_1 = 10 \mu$ l (20 μ l)
 Probe 2: $x_2 = 20 \mu$ l (50 μ l)
 Probe 3: $x_3 = 50 \mu$ l (100 μ l)

Die in Klammern gesetzten Werte beziehen sich wieder auf das entweißte Serum.

Das weitere Vorgehen entspricht dem Trypsin-Hemmtest, jedoch ist hier eine Inkubationszeit von 10 Minuten vor Zugabe des Suc-(Ala)₃-Nan nötig.

5.5. Die Immunelektrophorese nach LAURELL (44)

5.5.1. Das Prinzip

In einem Agarosegel werden Antikörper gegen α_1 PI gelöst. Das Gemisch wird auf eine Glasplatte aufgetragen. In kleine vorgestanzte Löcher gibt man das Antigen, sprich das Serum, auf die Platte und legt ein elektrisches Feld an. In diesem Feld wandern die Antigene und bilden dort, wo sie mit den gegen sie gerichteten Antikörpern reagieren, Präzipitationslinien, die wie Raketen aussehen (s. Abb. 10, p. 24 und Abb. 22, p. 45). Die Höhe der Raketen hängt von der Antigenkonzentration, d.h. hier von der des α_1 PI im Serum ab.

5.5.2. Die Reagenzien

5.5.2.1. Vorbereitung der Agarose

Die Agarose wurde mit aqua dest. zu einer 2%igen Lösung verdünnt.

5.5.2.2. Vorbereitung des Stamppuffers

77 g Natriumdiäthylbarbiturat, 13,8 g Barbitursäure und 1,0 g Natriumazid mit aqua dest. auf 5 l auffüllen (pH = 8,6).

5.5.2.3. Die Antikörper

Es wurde mit Behring-Antiserum vom Kaninchen gearbeitet.

5.5.2.4. Vorbereitung des Serums

Das native Serum wurde 1:20 mit aqua dest. verdünnt, der Überstand blieb unverdünnt.

5.5.2.5. Färber und Entfärber

Gefärbt wurde mit Coomassie brilliant blue.

Für den Entfärber wurden 900 ml Äthanol und 100 ml Eisessig gemischt.

5.5.3. Durchführung

Die Agaroselösung wurde bis zur Bildung einer klaren Lösung erhitzt. In einem Reagenzglas wurden 200 µl Antiserum mit 8 ml Agarose und 8 ml Stamppuffer gemischt und diese Lösung rasch auf einen Diapositivträger (10 X 10 cm) aufgetragen.

Nach Erstarren der Agarose wurden mit Stanzkanülen (2 mm, bzw. 3 mm Ø) und einer Schablone die Auftragstellen für das Serum in die Gelschicht gestanzt. Dabei wurde zwischen zwei benachbarten Lochzentren ein Abstand von 5 mm belassen.

In die Löcher wurden 5 µl der Serumverdünnung gegeben, bzw. 10 µl

des unverdünnten enteiweißten Serums. Die Elektrophorese lief bei 50 V über Nacht, ca. 16 Stunden.

Nach dem Trocknen - Pressen der Platten zwischen Filterpapier - wurden die Platten mit Coomassie brilliant blue gefärbt. Nach Entfärben mit dem Äthanolessig werden die Raketen deutlich sichtbar.

Mit der PEAK SCALE LUPE 7X wurden zwischen Lochzentrum und Raketenspitze die Peaks bis auf 1/10tel mm genau vermessen. Dabei wurden für jedes Serum und jeden Überstand zwei Werte bestimmt, aus denen das Mittel bestimmt wurde.

Um die Peaks verschiedener Platten miteinander vergleichen zu können, lief auf jeder Platte - auch im Doppeltest - ein Standard mit. Die Peaks der Platte, auf der dieser Vergleichswert die größte Höhe erreichte, blieben unkorrigiert.

Der Standard dieser Platte wurde mit 100% gewertet. Erreichte dann der Standard einer anderen Platte z.B. nur 50% dieser Höhe, so wurden alle Peakwerte der Platte verdoppelt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Mit dem Trypsin- und Elastasehemmtest wurde die IA gegenüber Trypsin und Elastase für 107 native und dann enteweißte Seren bestimmt.

Es zeigte sich, daß während des Denaturierens die Säure den α_1 PI bis auf eine kleine Restaktivität zerstört. Auch in der Immunelektrophorese ließen sich α_1 PI-Reste, sprich Antigendeterminanten, nachweisen. Inhibitorische Aktivität der enteweißten Seren und durch die Elektrophorese bestimmte α_1 PI-Konzentration erwiesen sich jedoch als voneinander unabhängig.

Während die Trypsinhemmung der Serumüberstände analog zu früheren Untersuchungen mit dem HI-30 zu erklären war, konnte die säurestabile Elastasehemmung keinem der derzeit bekannten Inhibitoren des Humanserums zugeschrieben werden.

Daraus wurde auf das Vorhandensein von noch unbekannten Elastaseinhibitoren im menschlichen Serum geschlossen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ASCOLI, M., BEZZOLA, C.: Berl. Klin. Wschr. 40, 391 (1903)
2. ASTRUP, T., STERNDOERF, J.: Scand. J. clin. Lab. Invest. 7, 239 (1955)
3. ASTRUP, T., NISSEN, U.: Natur (London) 203, 255-257 (1964)
4. BIETH, J.G.: Front. Matrix Biol. 8, 216-227 (1980)
5. BIETH, J.G., AUBRY, M., TRAVIS, J.: Bayer-Symposium V "Proteinase-Inhibitors", 53-62 (1974)
6. BIETH, J.G., MIESCH, F., MÉTAIS, P.: Ann. Bio. Clin. 29, 51 (1971)
7. BARRET, A.J., STARKEY, P.M.: Biochem. J. 133, 709-724 (1973)
8. BORGSTRÖM, A., KUKORA, J., OHLSSON, K.: Hoppe-Seyler's Z. 361, 633-640 (1980)
9. BRIEGER, L., TREBING, J.: Berl. Klin. Wschr. 45, 1041 (1908)
10. BUNDY, H.F., MEHL, J.W.: J. Biol. Chem. 234, 1124 (1959)
11. CRAWFORD, I.P.: Arch. Biochem. Biophys. 156, 215-222 (1973)
12. DIETL, T., DOBRINSKI, W., HOCHSTRASSER, K.: Hoppe-Seyler's Z. 360, 1313-1318 (1979)
13. EISNER, G.: Zschr. f. Immunitätsforschung Orig. I, 650 (1908/09)
14. ERIKSSON, S.: Acta. med. scand. 177, Suppl. 175 (1965)
15. FERMI, C., PERNOSSI, L.: Zschr. Hyg. 18, 83 (1894)

16. GUSTAVSSON, G.-L., OHLSSON, K., OLSSON, A.-S.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 169-176 (1980)
17. HARPEL, P.C., MOSESSON, M.W., COOPER, N.R.: Cold Spring Harbor Conf. Cell. Proliferation, Vol. 2, Proteases and Biological Control, Cold Spring Harbor Lab. 1021 ff. (1975)
18. HALL, P.K., ROBERTS, R.C.: Biochem. J. 173, 27-38 (1978)
19. HARTLEY, B.S.: Ann. Rev. Biochem. 29, 45-72 (1960)
20. HECHT, A., LUNZENAUER, K., SCHUBERT, E.: Allgemeine Pathologie (1977)
21. HEDIN, S.G.: J. Physiol. 30, 195 (1903/04)
22. HEIDE, K., HEIMBURGER, N., HAUPT, H.: Clin. Chem. Acta 11, 82-85 (1965)
23. HEIMBURGER, N., HAUPT, H., SCHWICK, H.G.: Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, 1-21 (1970)
24. HEIMBURGER, N.: s. Ref. 5, p. 14-22 (1974)
25. HOCHSTRASSER, K., FEUTH, H., FALL, J., KEMKES, B., WERLE, E.: Klin. Wschr. 52, 1018-1020 (1974)
26. HOCHSTRASSER, K., FEUTH, H., FALL, J., KEMKES, B.: s. Ref. 25, p. 1015-1017 (1974)
27. HOCHSTRASSER, K., FEUTH, J., STEINER, O.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 927-932 (1973)
28. HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R., SCHWARZ, S., WERLE, E.: s. Ref. 27, p. 923-926 (1973)

29. HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R., SCHWARZ, S., WERLE, E.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 221-226 (1972)
30. HOCHSTRASSER, K., SCHÖNBERGER, Ö.L., ROSMANITH, I., WACHTER, E.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1357-1362 (1981)
31. HOCHSTRASSER, K., SCHUSTER, R., REICHERT, R., HEIMBURGER, N.: s. Ref. 29, p. 1120-1124 (1972)
32. HOCHSTRASSER, K., BRETZEL, G., FEUTH, H., LEMPART, K.: Klin. Wschr. 55, 153-162 (1977)
33. HOCHSTRASSER, K., NIEBEL, J., FEUTH, H., LEMPART, K.: Klin. Wschr. 55, 337-342 (1977)
34. HOCHSTRASSER, K., WACHTER, E.; s. Ref. 12, p. 1285-1296 (1979)
35. JAKOBSSON, K.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 14 (1955)
36. JEPSSON, J.-O., LAURELL, C.-B.: s. Ref. 5, p. 23-30 (1974)
37. KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie (1977)
38. KLUMPP, T., BIETH, J.G.: Clin. Chem. 25/6, 969-972 (1979)
39. KONINGS, C.H.: Clin. Chem. 23/9, 1760-1763 (1977)
40. KRESS, L.F., LASKOWSKY Sr., M.: s. Ref. 5, p. 23-30 (1974)
41. KÜPPERS, F.: s. Ref. 5, p. 40-46 (1974)
42. LASKOWSKY Jr., M., KATO, I.: Ann. Rev. Biochem. 49, 593-626 (1980)
43. LANDSTEINER, K.: Zbl. Bakt. 27, 357 (1900)

44. LAURELL, C.-B.: *Analytical Biochem.* 15, 45-53 (1966)
45. MARTODAM, R.R., LIENER, I.E.: *Biochem. et Biophys. Acta* 667, 328-340 (1981)
46. MEYER, K.: *Folia serolog.* VII, 472 (1911)
47. MORAWITZ, P.: *Ergebn. Physiol.* 4, 307 (1905)
48. OHLSSON, K.: s. Ref. 5, p. 96-105 (1974)
49. OHLSSON, K., OLSSON, A.-S.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359 (1978)
50. OROCHSCH, G.J., NORDSCHOW, C.D.: *Intersoc.* 261 (1972)
51. PALITZSCH, D.: *Systematik der praktischen Pädiatrie* (1976)
52. PEANASKY, R.J., LASKOWSKY Sr., M.: *J. Biol. Chem.* 204, 153 (1953)
53. RABAUD, F., LEFEBVRE, F., LAMAZIERE, J.M.D., BEMURAT, M., BRICAUD, H.; *Clin. Chem. Ac.* 90, 53-60 (1978)
54. RHODES, M.B., BENNET, N., FEENY, R.E.: *J. Biol. Chem.* 235, 1686-1693 (1960)
55. SCHETTLER, G.: *Innere Medizin, Bd. II* (1980)
56. SCHMITZ, A.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 255, 234 (1938)
57. SCHUSTER, R.: *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität zu München* (1974)
58. SHULMAN, N.R.: *J. Biol. Chem.* 213, 655-671 (1955)

59. TRAVIS, D., JOHNSON, D., PANELL, R.: s. Ref. 11, p. 1305-1311 (1973)
60. WACHTER, E., HOCHSTRASSER, K., BRETZEL, G., HEIDEL, S.: s. Ref. 12, p. 1297-1303 (1979)
61. WACHTER, E., HOCHSTRASSER, K.: s. Ref. 12, p. 1305-1311 (1979)
62. WIENS: Münch. Med. Wschr. 2637 (1907)

LEBENS LAUF

Geboren: 4.5.1956 in Hamburg

Eltern: Nikolaus Freiherr von Schoenaich,
Kaufmann
Dr. phil. Helga Freifrau von
Schoenaich, geb. Liebich

Schule: 1963 - 1967 Grundschule und
1967 - 1975 Humanistisches
Gymnasium in Hamburg

Studium: 1975 - 1977 Medizin in Antwerpen
(Belgien)
1977 - 1980 in Mainz
1980 - 1983 in München

Examen: 5.12.1983 Ärztliche Prüfung in
München

Approbation: 14.12.1983 Erteilung der Appro-
bation als Arzt

Promotion: 27.3.1984 Tag der mündlichen
Prüfung

